

---

**Aus der Klinik für Anästhesiologie/ Abteilung für Transfusionsmedizin**

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Bernhard Zwißler

**Initiale Plättchen-Adhäsion durch GpIb - VWF Interaktion führt bei hohen Scherraten  
zur Entstehung gerinnungsaktiver Mikropartikel**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Hanno Martin Specht

aus

Ulm

2013

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Armin J. Reiningner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Bernd Engelmann

Prof. Dr. Wolfgang Hugo Hartl

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 20.06.2013

**Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet**

Teile dieser Arbeit finden sich in:

**Blood** 2006 May 1;107(9):3537-45. Reininger AJ., Heinen HF, Schuhmann H, **Specht HM**, Schramm W, Ruggeri ZM.: Mechanism of platelet adhesion to von Willebrand factor and microparticle formation under high shear stress

# Inhalt

1	Abkürzungsverzeichnis.....	1-6
2	Einleitung .....	2-7
2.1	Die Hämostase.....	2-8
2.2	Thrombozyten .....	2-9
2.3	Mikropartikel.....	2-10
2.4	Von Willebrand Faktor .....	2-12
2.5	Die Bedeutung der VWF-GPIIb/IIIa-Achse für die Thrombozytenadhäsion .....	2-13
2.6	Tissue Faktor.....	2-15
2.7	Thrombin .....	2-16
2.8	Thrombozytopenie und deren Therapie .....	2-17
3	Fragestellung.....	3-18
4	Material und Methoden .....	4-19
4.1	Material .....	4-19
4.1.1	Thrombozytenkonzentrate.....	4-19
4.1.2	Spenderblut .....	4-19
4.1.3	Geräte.....	4-20
4.1.4	Verbrauchsmaterialien .....	4-21
4.1.5	Chemikalien, Enzyme, Antikörper .....	4-21
4.2	Methoden.....	4-22
4.2.1	Flusskammer .....	4-22
4.2.2	Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (RICM).....	4-23
4.2.3	Videoanalyse .....	4-25
4.2.4	Kegel-Platte-Rheometer .....	4-29
4.2.5	Durchflusszytometrie .....	4-30
4.2.6	TDT-Test.....	4-32
4.2.7	Thrombozytenaggregometer Multiplate®.....	4-35
4.2.8	Statistische Auswertung .....	4-37
5	Ergebnisse .....	5-37
5.1	Scherungsinduzierte Generierung von Mikropartikeln im Kegel-Platte-Rheometer .....	5-37

5.2	Einfluss der Lagerungsdauer auf Thrombozytenkonzentrate .....	5-41
5.2.1	Videoanalyse der Flusskammerexperimente .....	5-41
5.2.2	Durchflusszytometrische Untersuchung der Thrombozytenkonzentrate hinsichtlich der Anzahl der Mikropartikel sowie der Änderung der Aktivierungsmarker im Laufe der Lagerungsdauer .....	5-47
5.2.3	Starker Einfluss der Lagerungsdauer auf die Aggregationsfähigkeit in den Multiplate Untersuchungen .....	5-51
5.2.4	Anstieg der Thrombingenerierungskapazität von TK im Verlauf der Lagerungsdauer im TDT Test .....	5-52
6	Diskussion .....	6-53
7	Zusammenfassung .....	7-57
8	Bibliographie .....	8-59
9	Danksagung.....	9-64

# 1 Abkürzungsverzeichnis

AU	Aggregation Unit
AUC	Area under the curve
CD	Cluster of Differentiation
C&P	Cone and Plate
CTI	Corn Trysin Inhibitor
DAP	Discrete Adhesion Point = Vorbestimmter Anheftungspunkt
Fab	Antigen binding fragment = Antigen bindende Region des Antikörpers
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward Scatter
FL1	Fluoreszenzkanal 1
FL4	Fluoreszenzkanal 4
GP	Glykoprotein
I	Fibrinogen
II	Prothrombin
MP	Mikropartikel
MPV	Mean Platelet Volume
MW	Mittelwert
p	Pearson Koeffizient
PE-Cy5	Tandem Konjugat aus Phycoerythrin und dem Cyanin Cy5
PRP	Platelet Rich Plasma = Plättchen reiches Plasma
PPP	Platelet Poor Plasma = Plättchen armes Plasma
PS	Phosphatidylserin
RT	Raumtemperatur
SD	Standard Deviation = Standardabweichung
SEM	Standard Error of the Mean = Standardfehler
SSC	Sideward Scatter
TDT	Thrombin Dynamics Test
TF	Tissue Faktor = Gewebsthromboplastin
TK	Thrombozytenkonzentrat
V	Proaccelerin
VII	Proconvertin
VWF	von Willebrand Faktor
VWF-dA1	Dimeric A-1 = rekombinante dimere A-1 Domäne des VWF
X	Stuart Prower Faktor

## 2 Einleitung

Schon seit geraumer Zeit ist die Existenz von Mikropartikeln im menschlichen Blut bekannt[1]. Man konnte diese in geringer Zahl sowohl bei gesunden Personen, als auch in stark erhöhter Konzentration bei bestimmten Erkrankungen nachweisen. Pathologische Zustände, die mit einer erhöhten Zahl an Mikropartikeln einhergehen, sind z.B. die Koronare Herzerkrankung[2], Adipositas, septischer Schock[3] und ebenso zahlreiche Tumorerkrankungen[4]. Mikropartikel können auf mannigfaltige Art und Weise entstehen und doch wurde in der Vergangenheit meist lediglich die Existenz der MP nachgewiesen, es blieb jedoch unmöglich, den Entstehungsprozess selbst zu beobachten. Durch Adaption einer Methode der real-time Mikroskopie (RICM) zur Beobachtung der Thrombozyten unter linearen Strömungsbedingungen verbunden mit einem Videoaufnahmesystem war es uns erstmals möglich, die Entstehung von Mikropartikeln unter direkter Beobachtung in Echtzeit aufzuzeichnen und sie anschließend nach Perfusionsfixierung durch Elektronenmikroskopie und funktionelle Assays näher zu charakterisieren. Die hierbei gewonnenen Erkenntnisse zur scherinduzierten Bildung von Mikropartikel führten in einem zweiten Schritt zur Aufdeckung eines neuen Mechanismus der Plättcheninteraktion, der ausschließlich auf einer temporären GpIb-VWF Interaktion ohne Aktivierung der Plättchen beruht. Diese Erkenntnisse bezüglich der initialen Plättchenadhaesion wurden anschließend in vitro an unter klinischen Routinebedingungen gelagerten TK in einer Flusskammer mit wandparalleler Strömung und per Durchflußzytometrie sowie mit Hilfe funktioneller Gerinnungsassays über einen Zeitraum von sieben Tagen untersucht. TK sind heutzutage wie viele andere Blutprodukte zu einem elementaren Bestandteil der modernen Hochleistungsmedizin geworden. Ob nun zur Therapie akuter Blutungen nach großen Blutverlusten oder zur Blutungsprophylaxe nach Chemotherapie induzierter Thrombozytopenie, die ständige Verfügbarkeit von TK ist von enormer klinischer Wichtigkeit. Als großes Problem erweist sich hier die beschränkte Lagerungsdauer, welche die ständige Vorratshaltung von TK zu einer großen logistischen Herausforderung macht. Während bei anderen Blutprodukten durch eine Lagertemperatur knapp über dem Gefrierpunkt eine Aufbewahrung über Monate ermöglicht wird, ist bei Thrombozyten eine Lagerung bei Raumtemperatur notwendig, um eine Aktivierung und Zerstörung der TK zu vermeiden [5]. Diese Temperatur birgt natürlich die erhöhte Gefahr

einer bakteriellen Kontamination. Trotz verbesserter Produktionsverfahren ist dies eine sehr ernst zu nehmende Gefahr wie aus den aktuellen Hämovigilanzdaten des Paul-Ehrlich-Instituts hervorgeht. So befanden sich alle TK, deren Verabreichung zu einer tödlichen Infektion mit humanpathogenen Erregern führte, am Ende Ihrer Haltbarkeitsdauer[6]. Daher erscheint eine Verlängerung der aktuell genehmigten Haltbarkeitsdauer (4x24h + Herstellungstag) aus mikrobiologischer Sicht zum aktuellen Zeitpunkt nicht sinnvoll. Doch ist im Rahmen verbesserter GMP-konformer standardisierter Produktionsverfahren mit einer Eindämmung dieses Risikos zu rechnen, so dass dann die Funktionsfähigkeit der TK auch nach prolongierter Lagerung eine logistische und auch ökonomische Bedeutung gewinnt. Die folgenden Experimente sollen dazu beitragen, die Qualität der Thrombozyten innerhalb der gesetzlich vorgeschriebenen Lagerungsfrist und darüber hinaus zu beurteilen

Die Arbeit beginnt mit einem kurzen Überblick über das Gerinnungssystem und geht hier insbesondere auf die Effektoren der zellulären Hämostase ein und gibt einen Einblick in die gängige Verwendungspraxis von TK. Anschließend werden die von mir durchgeführten Experimente dargestellt und die hierbei gewonnenen Daten im Ergebnisteil aufgeführt. Die Diskussion versucht dann, diese Daten im Kontext der bereits bestehenden Wissenslage zu interpretieren und die wesentlichen Erkenntnisse herauszuarbeiten.

## 2.1 Die Hämostase

Die Hämostase (von griechisch: Hämä = Blut und Stasis = Stillstand, Stockung) ist ein lebenswichtiger Prozess, der den Körper bei Verletzungen vor größeren Blutverlusten bewahrt. Das komplexe Zusammenwirken zwischen Plasmaproteinen, zellulären Bestandteilen des Blutes sowie der arteriellen Gefäßwand wird im folgenden beispielhaft dargestellt [7].:

- Vaskuläre Hämostase: Die *Membrana elastica interna* kontrahiert sich nach einer Verletzung der Gefäßintegrität stärker als die übrigen Wandschichten. Dadurch stülpt sich die Gefäßinnenwand in das Lumen der Arterie oder Arteriole und führt somit zu einem schnellen, provisorischen und meist inkompletten Verschluss[8].
- Zelluläre Hämostase: Haupteffektoren der zellulären Hämostase sind die Thrombozyten. Durch schnelle Anheftung (Adhaesion) sowie gegenseitige



Verklumpung (Aggregation) wird eine Abdeckung der Blutungsstelle ermöglicht. Bei der Anheftung muss hier zwischen einer initialen transienten Adhaesion und einer folgenden permanenten Adhäsion unterschieden werden[9]. Für den jeweiligen Prozess sind unterschiedliche Oberflächenrezeptoren verantwortlich. Hierauf wird im folgenden Kapitel näher eingegangen. Zudem wirken von den Thrombozyten abgegebene Substanzen auf die beiden anderen Säulen der Hämostase: Vasokonstriktoren zur Verstärkung der arteriellen Kontraktion wie z.B. das Serotonin sowie Prokoagulantien zur Beschleunigung der plasmatischen Hämostase[10].

- Plasmatische Hämostase: Durch das hierbei entstehende Fibrin wird der Plättchenthrombus verfestigt. Dies sorgt für einen dauerhaften Verschluss der Verletzungsstelle[7].

Im Folgenden werde ich nun näher auf die zelluläre Hämostase eingehen:

## **2.2 Thrombozyten**

Erstmals charakterisiert wurden diese in unabhängigen Forschungsarbeiten am Ende des 19. Jahrhunderts als farblose Teilchen die deutlich kleiner sind als die schon bekannten roten und weißen Blutkörperchen[11]. Sie sind bikonvexe diskusähnliche Scheiben mit ca. 3µm Durchmesser und einer Dicke von ca. 1 – 1,5µm. Ihren Ursprung haben sie im Knochenmark als Membranabschnürungsprodukte von Megakaryozyten[12]. Eine einzelne dieser Riesenzellen produziert im Laufe ihrer Lebensdauer im Durchschnitt zwischen 1000 und 3000 Thrombozyten[13]. Zunächst sind diese Membranabschnürungsprodukte größer als die endgültigen Thrombozyten und oft kommt es dazu, dass zwei Thrombozyten zunächst noch durch einen dünnen Membranschlauch zu einem hantelförmigen Gebilde vereinigt sind. Man spricht daher bei dieser Vorstufe der Thrombozyten auch von Proplatelets[12]. Die endgültige Plättchenform bildet sich erst im Rahmen der systemischen Zirkulation heraus, wahrscheinlich im Bereich der Pulmonalarteriolen. Darauf deutet die Tatsache hin, dass die Anzahl der Proplatelets in präpulmonalen größer als in postpulmonalen Arteriolen ist[14]. Auf diese Weise werden pro Tag ca. 35 000 – 40 000 Thrombozyten/µl Blut neu gebildet [15]. Nach der Abgabe in das zirkulierende Blut beträgt die Überlebensdauer der Thrombozyten 7-10 Tage, danach werden sie in Lunge, Leber und vor allem in der Milz abgebaut.

Im Gefäßsystem überwachen die Thrombozyten kontinuierlich die Gefäßintegrität. Durch den hämodynamischen Prozess der axialen Migration werden die Erythrozyten von der Gefäßwand abgehoben, drängen hin zum Lumen und verdrängen hierdurch wiederum die Thrombozyten an den Randbereich der Strömung[16, 17]. Durch diese strömungsbedingte Entmischung und Umverteilung der Erythrozyten und Thrombozyten konzentrieren sich die Blutplättchen in der nur wenige Mikrometer dicken und dem Endothel anliegenden Plasmagrenzschicht. Hierdurch haben mit der Blutströmung bewegte Thrombozyten ständigen Kontakt mit dem Endothel und werden so passiv befähigt, die Gefäßwand nach etwaigen Defekten bzw. Leckagen abzusuchen. Dieser relative Überschuss an Thrombozyten im Bereich der Gefäßwand erklärt, warum in der klinischen Praxis erst ein Abfall der Thrombozytenzahl weit unterhalb des Normwerts zu Blutungsereignissen führt. Es erklärt aber auch warum bei einer Anämie, trotz eventuell suffizienter Thrombozytenzahl, schwere Blutungskomplikationen auftreten können[18]. Kommt es nun zu einer Aktivierung der Thrombozyten, z.B. durch frei liegende subendotheliale Kollagenfibrillen im Bereich einer verletzten Gefäßwand, beginnt eine komplexe Kaskade aus mechanischen Rezeptorinteraktionen und biochemischen Botenstoffen, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

Ihre reichhaltige Ausstattung mit enzymatischen Botenstoffen ermöglicht es den Thrombozyten zudem weiteren Blutplättchen an der Stelle einer Gefäßverletzung eine permanente Adhäsion zu erleichtern. So sind Plättchen in der Lage neben Fibrinogen, Thrombospondin und Faktor V auch noch in  $\alpha$ -Granula gespeicherten VWF, PAF, ADP und Calcium freizusetzen[19]. Dadurch erfolgt eine positive Rückkopplung auf die beiden anderen Säulen der Hämostase, zum einen durch ein Calcium- und ADP vermittelte Vasokonstriktion, zum anderen durch eine Verstärkung der Fibrinsynthese. Die Thrombozyten selbst ändern im Laufe des Aktivierungsprozesses ihre Form und erreichen durch das Ausstülpfen von Pseudopodien eine deutliche Vergrößerung ihrer Oberfläche sowie eine regelrechte Verzahnung.

## **2.3 Mikropartikel**

Klassischerweise werden als Mikropartikel Zellmembranfragmente mit einem Durchmesser von 0,1 - 1 $\mu$ m bezeichnet, deren Erstbeschreibung 1967 unter dem Begriff „*Platelet Dust*“

erfolgte[1]. Während man zunächst davon ausging, dass nur Blutplättchen als Quelle dieser Mikropartikel in Frage kamen, zeigte sich später, dass diese auch von verschiedenen anderen Zellen wie z. B. Leukozyten, Erythrozyten, glatte Muskelzellen und Endothelzellen abstammen können. Nach bisher gängiger Meinung entstehen Mikropartikel in Anwesenheit physiologischer Calciumkonzentrationen als eine Folge von Zellaktivierung oder als Zeichen einer eingeleiteten Apoptose[20].

Während wenig über den intravesikalen Anteil bekannt ist, besteht die Hülle der Mikropartikel aus einer doppelagigen Phospholipidmembran, die zellspezifische Rezeptoren entsprechend ihrer Herkunft aufweist. So kann man auf der Oberfläche monozytärer Mikropartikel den CD 14 Rezeptor, auf der Oberfläche thrombozytärer Mikropartikeln plättchenspezifische Antigene wie CD 42b oder CD 41 nachweisen. Somit ist mit Hilfe der Durchflusszytometrie eine Zuordnung der nachgewiesenen Mikropartikel zu ihren Ursprungszellen möglich.

Auf Mikropartikeln finden sich häufig Marker einer Zellaktivierung wie zum Beispiel P-Selektin und Phosphatidylserin. Diese sind ein Indikator für eine aktivierte Zellmembran, da sie bei einer intakten Zellmembran auf der Oberfläche nicht nachweisbar sind. Die Exposition der normalerweise auf dem inneren Membranblatt gelegenen Phosphatidylserinanteile bedeutet also, dass eine Membran-Umverteilung stattgefunden hat[21]. Zudem gelang bereits mehrfach der Nachweis von Tissue Factor auf MP, einem potenten Akzelerator der Gerinnungskaskade, so dass vermutet wurde, dass diese Mikropartikel Einfluss auf das Gerinnungssystem nehmen könnten[22]. Diese These wird dadurch untermauert, dass Mikropartikel unter zahlreichen pathologischen Konditionen erhöht sind, die mit einer Störung der Hämostase einhergehen. Erhöhte MP Konzentrationen konnten z.B. bei Zuständen nach Apoplexie oder Myokardinfarkt nachgewiesen werden[23] oder auch häufig bei Tumorerkrankungen[24]. Aber auch bei Diabetes mellitus, Adipositas und Sepsis zeigt sich häufig eine deutlich erhöhte Anzahl zirkulierender Mikropartikel[25, 26]. Im Gegensatz dazu ist Ihre Anzahl z.B. beim Scott Syndrom, einer hereditären hämophilen Diathese, deutlich vermindert[23]. Die Herkunft der Mikropartikel scheint abhängig von der Art der Erkrankung zu variieren. So finden sich bei Patienten mit Diabetes mellitus hauptsächlich Mikropartikel granulo-, mono- oder lymphozytärer Herkunft, während die in geringen

Mengen auch bei gesunden Patienten nachweisbaren Mikropartikel überwiegend thrombozytärer Genese sind[25].

## 2.4 Von Willebrand Faktor

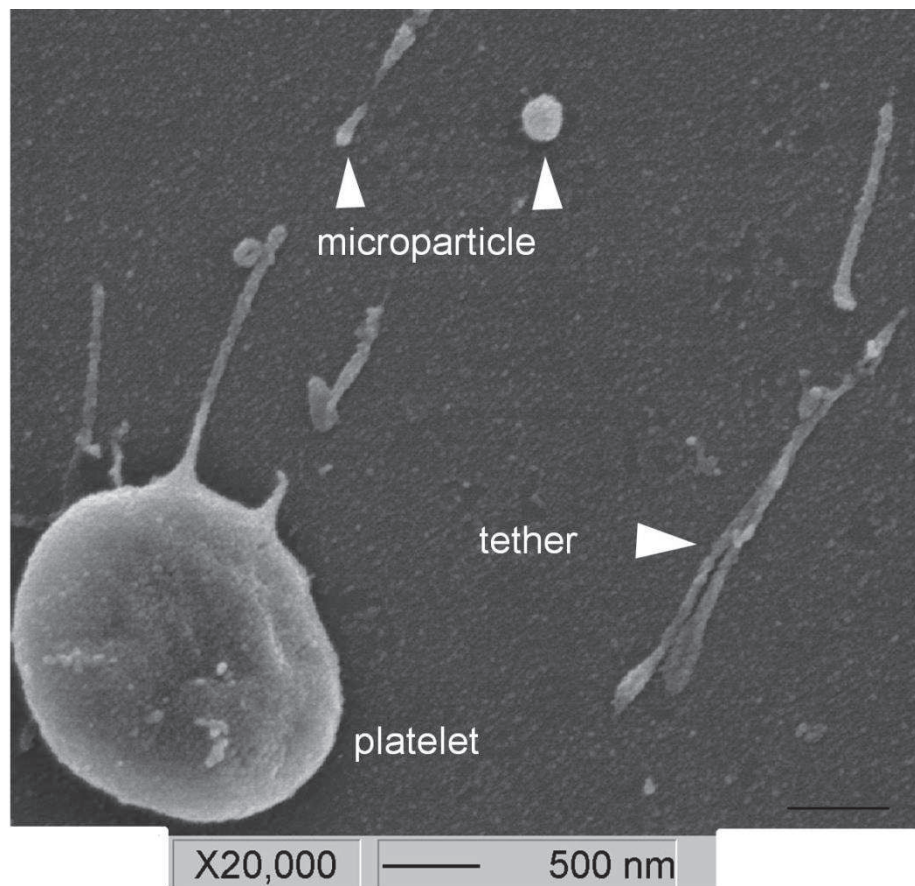
Der VWF hat im Rahmen der komplexen Gerinnungskaskade im Wesentlichen zwei Funktionen. Zum Einen dient er dem Gerinnungsfaktor F VIII als Transportprotein und schützt dieses vor einem vorzeitigen enzymatischen Abbau. Zum Anderen vermittelt der VWF die Plättchenadhäsion und nimmt damit eine zentrale Rolle in der primären Hämostase ein. VWF ist das größte bekannte Plasmaprotein (Molekulargewicht des Monomers: 278 kDa) und findet sich im Plasma als Multimere von > 500 kDa bis hin zu Polymeren mit einer Größe von mehr als 10000 kDa[27]. Bei physiologischen Strömungsgeschwindigkeiten wird der VWF in geknäuelter Form transportiert, wodurch seine A-1 Bindungsdomänen für den thrombozytären Gplb Rezeptor nicht exponiert sind. Mit einer Erhöhung der Scherrate über eine kritische Grenze von  $\gamma_{\text{crit}} = 5\,000\text{s}^{-1}$  geht der VWF in eine elongierte Form über[28], was zur Exposition einer Bindungsstelle innerhalb der A1 Domäne führt und somit wiederum die Adhäsion von Thrombozyten mittels des GPIb-Rezeptors ermöglicht[29]. Diese Veränderung ist rein scherungsabhängig und reversibel. Sobald die Scherungsrate erneut unter die kritische Schwelle sinkt, faltet sich der VWF wieder in die ursprüngliche, geknäulte Form zurück[28]. Der VWF Faktor ist in der Lage, sich mit Hilfe seiner A3-Domäne an subendotheliale Bindegewebsstrukturen wie z. B. fibrilläres Kollagen Typ I und Typ III anzuheften[30] und ermöglicht somit zum einen die initiale Plättchenadhäsion mittels der GPIb-VWF Interaktion und zudem auch den permanenten Plättchenarrest an der Verletzungsstelle durch Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Interaktion. Im Gegensatz zu anderen an der Blutstillung beteiligten Proteinen ist der VWF also ein Agonist der ersten Sekunde, das heißt, falls es zu einer Blutung kommt ist der im Plasma zirkulierende VWF sofort alleine durch die Änderung der Strömungsbedingungen einsatzbereit und muss nicht zuerst enzymatisch aktiviert werden[31]. Dies macht natürlich nur Sinn, da der Interaktionspartner GPIb auf der Plättchenmembran in großer Zahl präsent ist und somit alleine durch die Exposition der A-1 Domäne eine Plättchenadhäsion ermöglicht wird. Zusätzlicher VWF kann dann aus Speichern in Form der thrombozytären  $\alpha$ -Granula sowie aus Endothelzellen rekrutiert werden. Vor allem die hoch polymerisierten VWF-Moleküle („High molecular weight VWF,

Molekulargewicht > 6000 kDa) gelten als hämostatisch und thrombotisch aktiv[29]. Seine klinische Relevanz zeigt sich deutlich beim von Willebrand Jürgens Syndrom, das zu einer insuffizienten Blutstillung führt, insbesondere wenn das hämostatische System z.B. durch chirurgische Eingriffe belastet wird[32].

## 2.5 Die Bedeutung der VWF-GPIIb-IIIa-Achse für die Thrombozytenadhäsion

Die VWF bindende Domäne des GPIIb-IIIa-Rezeptorkomplexes befindet sich im N-Terminus der GPIIb Untereinheit und wird extrazellulär in einem 500 Å langen Proteinstrang exprimiert. Durch diese ist das Plättchen auch unter erhöhten Scherraten in der Lage, sich an die exponierte A1 Domäne des VWF anzuheften. Die Anheftung erfolgt hierbei über bestimmte Membranareale von ca. 0,05 – 0,25 µm<sup>2</sup> Größe, an denen sich bis zu 100 GPIIb-Rezeptoren befinden. Diese so genannten DAPs (*Discrete Adhesions Point*) sind in der Lage einer Kraft von bis zu 160 pN zu widerstehen. Durch die Ballung vieler Rezeptoren an einer diskreten Stelle (*Clustering*) entspricht dies lediglich einer Kraft von nur 1,6 pN pro Bindungsstelle und vermindert daher das Risiko einer Überbelastung und damit eines Funktionsverlustes der Einzelbindungsstelle[33]. Diese Interaktion ist jedoch nur von transients Dauer und kann nicht die Ausbildung eines dauerhaften Wundverschlusses bewirken. Hierzu ist die Beteiligung weiterer thrombozytärer Rezeptoren wie z.B. Integrin α2β1 oder GpVI nötig, die jedoch erst durch das VWF vermittelte Abbremsen möglich wird. Verhindert man diese nachträglichen Interaktionen, d. h. ermöglicht man nur die GPIIb-VWF Interaktion, kommt es dazu, dass der durch den Flüssigkeitsstrom auf den Plättchenkörper einwirkende Scherstress nach einer gewissen Zeit stärker wird als die durch die Oberflächen-Membran-Interaktion ausgeübte Haltekraft. Der Plättchenkörper bewegt sich nun in Strömungsrichtung und es zeigt sich das Bild des *Rolling*, d.h. das Plättchen „rollt“ mit gegenüber der Hauptströmung deutlich verminderter Geschwindigkeit von Bindungsstelle zu Bindungsstelle und kommt hiermit seiner Überwachungsfunktion der Gefäßintegrität nach. Die Geschwindigkeit mit der sich das Plättchen aufgrund der GPIIb-VWF Interaktion nun fortbewegt beträgt typischerweise nur noch ca. 2% der Geschwindigkeit, mit der sich ein nicht interagierendes Plättchen in dem gleichen Abstand von der Oberfläche, das heißt in der selben Strömungsschicht, fortbewegt[34]. Wird die von der Strömung auf das Plättchen ausgeübte Kraft nun noch stärker, so ergibt sich das Phänomen des Tethering, d.h. das

Plättchen adhäriert mit Hilfe der GPIb-VWF-Interaktion an der Oberfläche, jedoch wird nun aus dem Plättchen ein Membranschlauch analog einer Ankerleine herausgezogen, der das Plättchen letztendlich zum Stillstand bringt oder von diesem abreißt[35]. Dies ist ein passiver Vorgang der aktivierungsunabhängig stattfindet. Die Plättchenmembran zeigt sich auch nach der Tetherentstehung in einem inaktivierten Zustand und die so entstandenen Tether unterscheiden sich anhand ihres geringeren Durchmessers von aktiv ausgestülpten Pseudopodien.



**Abbildung 1 – Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Tether und Mikropartikel Entstehung:** Perfusionsfixiertes Präparat nach Perfusion von Citrat antikoagulierte Vollblut (250 000 Plättchen/ $\mu$ l) über eine mit VWF-DA1 beschichtete Oberfläche mit einer Scherrate von  $\gamma_w=30\,000\text{s}^{-1}$  (250 000 Plättchen/ $\mu$ l). Links unten im Bild adhärentes Plättchen in inaktivem Membranzustand mit davon ausgehendem Tether. Darüber isolierte Mikropartikel und rechts daneben elongierter Tether[33].

Hervorzuheben ist hier, dass die physiologische Relevanz der VWF-GPIb Interaktion analog zum Anstieg der Scherrate zunimmt. Während in einem Strömungsbereich von 0 –  $1000\text{s}^{-1}$  auch andere Rezeptoren an der primären Adhäsion beteiligt sind, wird deren Funktion mit zunehmender Scherrate immer unbedeutender. Diese Funktion wird hier mehr und mehr von der GPIb-VWF Interaktion übernommen um in Strömungsbereichen oberhalb



von  $10\,000\text{s}^{-1}$ , wie sie z.B. in einer zu 90% stenosierten Koronararterie vorkommen, schließlich vollständig darauf zu beruhen. Solche Scherraten spielen aber nicht nur bei pathologischen Zuständen eine Rolle sondern auch bei einem physiologischen Wundverschluss im Rahmen der regulären Hämostase, bei der die Scherraten stetig zunehmen, je kleiner die zu verschließende Blutungsstelle durch ständige Plättchenablagerung wird[36]. Wenn die Plättchen hier nicht befähigt wären, extremen Strömungsbedingungen zu widerstehen, dann wäre der Prozess der zellulären Hämostase stets kurz vor Erreichen des Wundverschlusses zum Scheitern verurteilt.

## 2.6 Tissue Faktor

Tissue Faktor (auch Blutgerinnungsfaktor III, CD 142, Thrombokinase oder Gewebsthromboplastin) ist ein 47 kDa großes Protein, das vor allem von glatten Muskelzellen der Gefäßwand exprimiert wird und dadurch das Gefäß wie eine schützende Hülle umgibt[37]. Das reife Protein besteht aus einer 219 Aminosäuren langen extrazellulären, einer 23 Aminosäuren umfassenden transmembranösen und einer 21 Aminosäuren kurzen zytoplasmatischen Domäne[38]. Kommt es zu einer Verletzung der Gefäßintegrität wird durch diesen intramuralen TF eine sofortige Aktivierung der extrinsischen Gerinnungskaskade eingeleitet. Hierbei wird das im Plasma gelöste Proconvertin (Faktor VII) durch den Kontakt mit TF im Beisein von Calcium zu Convertin (Faktor VIIa) aktiviert und ist dadurch in der Lage, die Faktoren X und IX zu aktivieren und so die Bildung von Thrombin sowohl auf dem extrinsischen Weg als auch über Faktor IXa und VIII über den intrinsischen Weg zu bewirken. Durch die Verknüpfung unterschiedlicher, sich gegenseitig aktivierender Signalwege wird eine starke Amplifikation des ursprünglichen Signals erreicht und damit die Gewährleistung einer raschen und effizienten Hämostase.[39]

Neben dem klassischen intramuralen TF konnte in neueren Forschungsarbeiten ebenfalls im Blut zirkulierender TF nachgewiesen werden. Dieser wurde als intravasaler oder *blood born* TF bezeichnet und war vor allem auf der Oberfläche von Blutzellen und Mikropartikeln nachzuweisen[40]. Der scheinbare Widerspruch, dass dieses hämostatisch höchst aktive Protein auch im Blut von gesunden Probanden nachgewiesen werden konnte erklärt sich dadurch, dass der TF hier zum Großteil in einer physiologisch inaktiven, einer sog. *encrypted*

Form vorliegt. In dieser Form ist er zwar in der Lage den aktivierten Faktor VIIa zu binden, jedoch ist er nicht in der Lage, selbstständig eine Aktivierung von Faktor VII auszulösen[41].

## **2.7 Thrombin**

Thrombin (Faktor IIa) stellt den gemeinsamen Endpunkt sowohl der extrinsischen als auch der intrinsischen Gerinnungskaskade dar. Das Zusammenlaufen beider Wege macht deutlich, dass hier einer der Knotenpunkte des Gerinnungsvorganges liegt.  $\alpha$ -Thrombin ist eine trypsinartige Serinprotease, die von der Leber als inaktives Prothrombin (Faktor II) synthetisiert und ins Plasma abgegeben wird. Dort wird es vor allem durch die aktivierte Form des Stuart-Prower-Faktors (Faktor Xa) in seine funktionell aktive Form gespalten und ist dadurch in der Lage, Fibrinogen (Faktor I) zu Fibrinmonomeren zu spalten und somit eine wirksame Hämostase zu bewirken. Aufgrund von positiven Rückkopplungsmechanismen ist durch eine gesteigerte Thrombin Entstehung bis zu 20 000-facher Beschleunigung der Gerinnungskaskade möglich[42].

Thrombin wirkt jedoch auch auf zellulärer Ebene, indem es direkt Endothelzellen, Leukozyten und Plättchen aktivieren kann. Diese Aktivierung erfolgt G-Protein vermittelt mit Hilfe spezifischer Thrombin Rezeptoren wie z.B. den Protease aktiviertem Rezeptoren (PAR-1,3,4), die auf Plättchen und Monozyten zu finden sind[43]. So werden z. B. aktivierte Monozyten durch Thrombin zur Bildung von Tissue Faktor angeregt, der nun wiederum über den extrinsischen Gerinnungsweg zur vermehrten Bildung von Thrombin führt[44]. Ebenso ist eine Aktivierung der Gerinnungskaskade mit Hilfe des GPIIb/IIIa-Komplexes möglich, bei dem die GPIIb Untereinheit in der Lage ist Thrombin zu binden[45]. Dies wiederum führt zur Expression prokogulanter Mediatoren auf der Plättchenoberfläche wie z.B. P-Selektin und Tissue Faktor.

Aufgrund dieses breiten Spektrums an physiologischen Funktionen kommt dem Thrombin eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese arterieller Thrombosen und vaskulärer arteriosklerotischer Läsionen zu[46].



## 2.8 Thrombozytopenie und deren Therapie

Der Einsatz von TK in der klinischen Routine begann mit der Einführung des Plastiklagerungsbeutels in den frühen 60er Jahren des 20. Jahrhunderts. Zunächst wurde das durch „weiche“ Zentrifugation gewonnene PRP direkt reinfundiert[47]. Den durchschlagenden Erfolg als Therapieoption bei Thrombozytopenie brachte aber erst die Erkenntnis mit sich, dass auch eine „harte“ Zentrifugation des PRP die Funktionsfähigkeit der Plättchen nicht verschlechtert und somit eine Konzentrierung der Blutplättchen und damit die Verabreichung therapeutischer Dosen möglich wurde[48].

Aufgrund der praktischen Alleinstellung als Organellen der zellulären Hämostase kommt den Thrombozyten eine herausragende Stellung in der primären Hämostase zu. Entsprechend gravierend sind die Folgen bei einem Fehlen der Blutplättchen. Da der plasmatische Teil der Blutgerinnung redundant abgesichert ist, zeigt der Verlust eines einzelnen Elementes der Kaskade oft keine unmittelbar dramatische Wirkung. Ganz anders sieht die Sache bei der nicht Verfügbarkeit von Thrombozyten aus. Deren Funktion kann von keinem anderen im Blut vorhandenen Teilchen übernommen werden und daher kommt es bei deren Verlust zu einer ineffektiven Blutstillung. Zum Glück sind normalerweise im Organismus immer Plättchen in Überzahl vorhanden, so dass auch bei einem Verlust von bis zu 90% der Thrombozyten die verbleibenden Blutplättchen immer noch in der Lage sind, eine ausreichende Blutstillung zu gewährleisten (durch Mechanismen die im vorausgehenden Text ausführlich beschrieben wurden wie z.B. die axiale Migration). Dennoch wird der Einsatz von TK in der modernen Hochleistungsmedizin immer häufiger, wie z. B. bei Zustand nach einer Massivblutung mit konsekutiven Volumenersatz[49], dem Zustand nach Chemotherapie mit einer Schädigung des blutbildenden Knochenmarks oder auch bei einer passageren, megakaryozytären Thrombozytopenie, die z.B. Alkohol, Medikamente oder Viren zur Ursache haben kann [50]. Dann stellt die Transfusion von TK oft die einzig wirksame Möglichkeit dar, lebensbedrohliche Blutungskomplikationen zu verhindern oder wirksam zu bekämpfen. Im Folgenden sind die Indikationen für den Einsatz von TK in der Chirurgie aufgelistet:

- Thrombozytenzahl < 50 000/ $\mu$ l und
  - Polytrauma [51]

- Mikrovaskuläre Blutung [52]
- Operativer Eingriff mit größerem Blutungsrisiko [53]
- Thrombozytenzahl < 100 000/μl und
  - Akute Blutungen die entweder massiv oder bedrohlich sind oder bei denen ein Transfusionsbedarf von mehr als einem EK/d besteht [51, 53]
  - Operationen mit hohem Blutungsrisiko [53]
  - Traumatische Hirnschädigung [51]

### 3 Fragestellung

Diese Arbeit knüpft in einem ersten Teil an die bisherige Forschungsarbeit der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Reininger an, in der ein möglicher Weg zur Entstehung thrombozytärer Mikropartikel durch die Interaktion einer immobilisierten VWF-Oberfläche mit Blutplättchen unter hohen Scherraten visualisiert wurde. Ob dieser Mechanismus auch bei der Entstehung von Mikropartikeln ohne das Vorhandensein von immobilisiertem VWF eine Rolle spielt, ob diese MP Entstehung auf einer GpIb-VWF-Interaktion beruhte und ob diese so erzeugten MP selbst prokoagulatorisches Potential besitzen waren die Fragen, die ich mit den Kegel-Platte-Rheometer Versuchen klären wollte. Die Kegel-Platte-Rheometer Versuchsanordnung erschien dazu gegenüber der Flusskammer vorteilhaft, da hier alle in der Probe enthaltenen Plättchen über einen längeren Zeitraum dem definierten Scherstress ausgesetzt sind und nicht nur die Plättchen im Randsaum der Strömung. In der Flusskammer wirkt der Scherstress außerdem nur während des kurzen Zeitraums der Flusskammerpassage. Die Hypothese war daher, dass die Zahl der in den Kegel-Platte Versuchen erzeugten Mikropartikel um ein Vielfaches größer ausfällt als in den bisherigen Flussversuchen. Die Ergebnisse meiner Versuche gingen in die 2006 in der Zeitschrift „Blood“ veröffentlichte Publikation mit ein[33].

Desweiteren wollte ich herausfinden, welchen Einfluss die Lagerungsdauer auf die Funktionsfähigkeit von TK unter hohen Scherraten hat. Zwar wurde in den letzten Jahren viel über Einfluss der Lagerungsdauer auf TK geforscht, jedoch basieren die meisten Erkenntnisse

auf Experimenten bei niedrigen Scherraten oder gar in Stase, wie sie funktionell für Thrombozyten wenig relevant sind. Die Versuche mit der Strömungskammer erlaubten es mir die Plättchenfunktion unter extremen Strömungsbedingungen zu testen, also in einer Situation, in der eine intakte Plättchenfunktion überlebenswichtig sein kann. Die zusätzlichen Messungen im Durchflusszytometer ermöglichten zudem Aussagen über die Aktivierung von Plättchen, Veränderungen der Morphologie und eine eventuelle MP Generierung. Die koagulatorischen Auswirkungen dieser Plättchenaktivierung auf die Thrombinentstehung wurden mit Hilfe des TDT-Testes quantifiziert. Das übergeordnete Ziel dieser Versuche war es herauszufinden, ob TK innerhalb der in den gesetzlichen Rahmenbedingungen vorgegebenen Lagerungsdauer an funktioneller Qualität verlieren (insbesondere unter dem Aspekt von Strömungsbedingungen mit hohen Scherraten) und ob aus funktioneller Sicht eine Verlängerung der aktuell vorgegebenen Lagerungsdauer möglich und sinnvoll erscheint.

## **4 Material und Methoden**

### **4.1 Material**

#### **4.1.1 Thrombozytenkonzentrate**

Die untersuchten Thrombozytenkonzentrate entstammen der regulären Produktion der Abteilung für Transfusionsmedizin des Klinikums Großhadern und wurden per Single Apherese Verfahren gewonnen. Während des Untersuchungszeitraumes wurden die TK protokollgemäß im Institut für Transfusionsmedizin auf Schüttlern bei RT gelagert und am jeweiligen Versuchstag wurde das entsprechende Probevolumen anhand eines festgelegten Protokolls mit Hilfe eines Probedosierers entnommen. Für die Flussexperimente erfolgte eine Rekonstitution der TK durch Zugabe von Erythrozytenkonzentraten der Blutgruppe 0 und Plasmakonzentraten der Blutgruppe AB, um eine Thrombozytenkonzentration von 200 000/ $\mu$ l und einen Hämatokrit von 40% zu erreichen. Die Zellkonzentrationen wurden per Impedanz-Analyse (Sysmex GmbH, Norderstedt, Germany) kontrolliert.

#### **4.1.2 Spenderblut**

Die Blutentnahme erfolgte bei gesunden Probanden mit Hilfe einer 19G Nadel aus einer Cubital Vene. Das Blut wurde mit Na-Citrat (3,8%) antikoaguliert und zusätzlich mit PGE<sub>1</sub> sowie Apyrase (1,5 ATPase U/ml) versetzt. Um plättchenreiches Plasma (PRP) zu erhalten, wurde das Blut bei 170g für 15 min bei 25° C zentrifugiert und der entstandene Überstand vorsichtig mit Hilfe einer Pipette abgehoben. Zur Herstellung von plättchenarmen Plasma (PPP) erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 1070g und 25° C für 15 min. Für einige Experimente wurde die Aktivierung der Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_{III}$  Interaktion durch Zugabe von 8 $\mu$ M Tirofiban blockiert. Die Wirksamkeit dieser Blockade wurde im Vollblutaggregometer (Multiplate, Dynabyte, München) überprüft. Zudem wurde für einige C&P Experimente die VWF – GPIb Interaktion durch Zugabe von NMC-4 Fab (Freundliche Überlassung durch Herrn Prof. Z. M. Ruggeri; Scripps Research Institute, La Jolla, CA) inhibiert. Die Experimente wurden von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München geprüft und in Übereinstimmung mit der Erklärung von Helsinki durchgeführt. Jeder Proband wurde über den Zweck der Blutentnahme aufgeklärt und hatte hierzu schriftlich sein Einverständnis bekundet.

#### 4.1.3 Geräte

Durchflusszytometer	Epics XL, Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)
Impedanzaggregometer	Multiplate („multiple platelet function analyzer“) Dynabyte Medical (München, Deutschland)
Koagulations Tester	ACL 9000, Instrument Laboratory (Barcelona, Spanien)
Mikroskop	Aufrechtes Mikroskop Axioskop 2 plus, Zeiss (Jena, Deutschland)
Rheometer	Haake Rheovisco 1, Thermo Electron Corporation, (Waltham, MA, USA)
Spritzsaugpumpe	Pump 33 Dual Syringe Pump, Harvard Apparatus (Holliston, MA, USA)
Sysmex Platelet Counter	PL-100, TOA Medical Electronics (Kobe, Japan)
Videokamera	Schwarz-weiß Videokamera AVT BC-71, AVT Horn (Aalen, Deutschland)

Videorecorder	NV-HS 930, Panasonic (Osaka, Japan)
---------------	-------------------------------------

#### **4.1.4 Verbrauchsmaterialien**

Butterflykanülen	Safety-Multifly-Set (19-Gauge), Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
------------------	---

Blutentnahmeröhrchen	S-Monvette 10ml Coagulation, Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
----------------------	--

Glasdeckgläschen	24 x 50 mm, Corning BV (Schiphol-Rijk, Niederlande)
------------------	---

#### **4.1.5 Chemikalien, Enzyme, Antikörper**

##### **4.1.5.1 Chemikalien**

Apyrase (Adenosindi-/triphosphatase)	A-6535, Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
---	--

Kollagenreagens	Horm <sup>®</sup> , Nycomed Pharma (Unterschleißheim, Deutschland)
-----------------	---

Soweit nicht anders im Text vermerkt, stammen alle weiteren verwendeten Chemikalien von der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

##### **4.1.5.2 Enzyme und Hormone**

Korntrypsininhibitor	CTI, Calbiochem, Merck Chemicals Ltd. (Darmstadt, Deutschland)
----------------------	---

Prostaglandin E <sub>1</sub>	PGE <sub>1</sub> , Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
------------------------------	---

##### **4.1.5.3 Antikörper**

Anti-Integrin $\alpha_{IIb}\beta_{III}$	Tirofiban, MSD Sharp & Dohme (Haar, Deutschland)
---	---

Anti-CD 41	Monoklonaler IgG1 Maus-Antikörper gegen humanes CD 41, FITC-konjugiert, IM 1756U, Immunotech (Marseille, Frankreich)
------------	---

Anti-CD 42b	Monoklonaler IgG1 Maus-Antikörper gegen humanes CD 42b, FITC-konjugiert, IM 0648U, Immunotech (Marseille, Frankreich)
-------------	--

Anti-CD 62P	Monoklonaler IgG1 Maus-Antikörper gegen humanes CD 62P, FITC-konjugiert A 51079, Immunotech (Marseille, Frankreich)
Annexin V	Annexin V-PE-Cy5, Biovision (Mountain View, CA, USA)
Mäuse Ig-G	FITC – Isotypenkontrolle, Immunotech (Marseille, Frankreich)
Anti-VWF	NMC-4 Fab, Prof. Z, Ruggeri Scripps Laboratories (La Jolla, CA, USA)

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Flusskammer

Um die Adhäsionsfähigkeit der Thrombozyten sowie deren Morphologie unter Fluss zu visualisieren wurden Versuche in einer Strömungskammer durchgeführt. Die konstante Strömung wurde durch eine Syringe-Pumpe (Harvard Apparatus, Boston, MA) erzeugt, die das auf 37° Celsius temperierte Blut aus einem Reservoir durch die Flusskammer saugte. Die Flusskammer selbst bestand aus einem Plastikquader mit Bohrlöchern als Zu- und Abfluss sowie einer auf diesen Quader aufgelegten Silikondichtung und einem abdeckenden Glasplättchen. Der eigentliche Flusskanal wurde zwischen Quader und Glasplättchen (Boden- und Deckplatte) und der Dichtungsmembran (Seitenwände) gebildet und durch eine Deckplatte mit Schrauben auf dem Quader fixiert (Schematischer Aufbau siehe Abb. 2)..

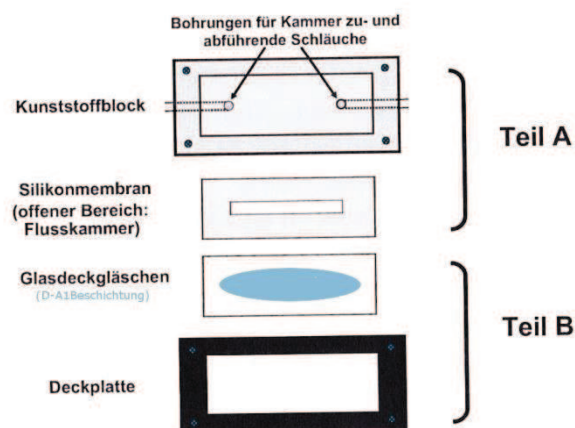


Abbildung 2 – Die Flusskammer setzt sich aus folgenden Elementen zusammen. Zum einen aus dem transparenten Plastikquader mit Bohrungen für den Zu und Ablauf. Darauf wird die Silikonmembran aufgelegt deren Dicke die Höhe des

Flusskanals bestimmt (Teil A). Zum Anderen aus dem Deckgläschen durch das eine Beobachtung der Strömung möglich wird sowie der Deckplatte, die mit Hilfe von vier Eckschrauben die einzelnen Elemente der Flusskammer miteinander verbindet (Teil B). Auf dem Deckgläschen kann nach Belieben eine Beschichtung aufgebracht werden (Für die hier aufgeführten Experimente wurde VWF-DA1 verwendet; Abbildung modifiziert nach [54]).

Die Wandscherrate wird zum einen durch die Dicke der verwendeten Silikonmembran und damit durch die Höhe des Flusskanales und zu anderen durch die Förderleistung der Pumpe und damit durch das Flussvolumen pro Zeiteinheit definiert. Innerhalb der laminaren Strömung wird die Scherrate durch den Geschwindigkeitsunterschied der einzelnen Laminae (Strömungsschichten) zueinander bestimmt. Daraus folgt, dass die Wandscherrate den Unterschied der Flussgeschwindigkeit als Funktion des Abstandes von der Gefäßwand wiedergibt[55]. Die Oberfläche des Deckgläschens wurde mit rekombinanten VWF-A1-Domäne-Dimeren (VWF-DA1) beschichtet. Dieses wurde aus dem Wachstumsmedium transfizierter *Drosophila Melanogaster* Zellen gewonnen und liegen durch eine Bindung über Disulfid Brücken als Dimer vor[56].

#### **4.2.2 Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (RICM)**

Eine Echtzeit-Beobachtung des Geschehens in der Flusskammer erfolgte mit einem Auflicht-Mikroskop (Axioskop 2 plus; Carl Zeiss, Germany) mit einem Antiflex Objektiv (Plan-Neofluar 63x/1,25 Oil Ph3; Carl Zeiss) mittels Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (RICM). Diese Technik erlaubte eine Beobachtung derjenigen Vorgänge, die direkt unter der Deckgläschenoberfläche stattfinden. Hierdurch wurde eine isolierte Betrachtung des wandnahen Strömungsbereiches möglich, ohne hierbei durch die Strömung im restlichen Kanal beeinträchtigt zu werden. Die Intensität der angezeigten Objekte korreliert hierbei mit ihrer Entfernung von der Oberfläche. Je näher sich das Objekt am Deckgläschen befindet, desto dunkler wird es angezeigt, je weiter weg desto heller. Die Funktionsweise der RICM-Technik wird durch folgende Grafik illustriert:

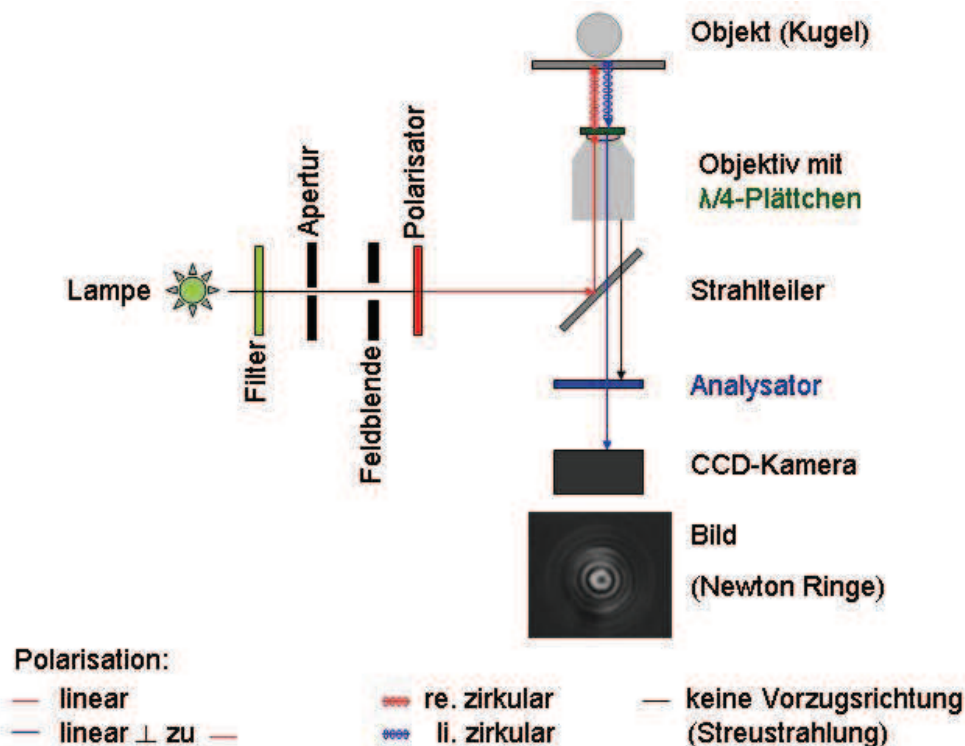


Abbildung 3 - Die hier dargestellte Abbildung gibt die Funktionsweise der RICM spiegelverkehrt zu dem von uns verwandten Aufbau wieder. Das einfallende Licht wird von einem Polarisator zunächst linear polarisiert und von einem Strahlenteiler in Richtung der Probe umgelenkt. Beim Durchlaufen des Objektivs wird ein  $\lambda/4$  Plättchen passiert, das das linear polarisierte Licht in zirkular polarisiertes Licht umwandelt. Beim Auftreffen auf die Probe ändert sich durch die Reflexionen die Polarisationsrichtung, sodass beim erneuten Durchlaufen des  $\lambda/4$  Plättchens linear polarisiertes Licht entsteht, das senkrecht zur ursprünglichen Richtung polarisiert ist. Bevor das Licht detektiert wird, muss es einen weiteren Polarisationsfilter, den sog. Analysator, passieren. Dieser ist nur für Licht exakt dieser Polarisationsrichtung durchlässig. Streuung und Reflexe erfolgen zum größten Teil im optischen Strahlengang vor dem  $\lambda/4$  Plättchen und führen daher zu Licht das senkrecht zu dem an der Probe reflektierten Licht polarisiert wird. Diese störende Strahlung wird durch den Analysator unterdrückt. Durch die zusätzlichen Komponenten Polarisator,  $\lambda/4$  Plättchen und Analysator kann eine deutliche Verbesserung des Kontrasts im Interferenzbild erreicht werden. Während die Auflösung eines Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskops in lateraler Richtung einem gewöhnlichen Lichtmikroskop entspricht, kann in axialer Richtung eine Auflösung von 5 nm erreicht werden. Das beobachtete Objekt wird analog seines Abstandes zur Oberfläche in Grautönen wiedergegeben (modifiziert nach [57])

Durch diese Technik ist es nicht notwendig, die zu beobachtenden Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen zu markieren. Die Vorgänge entlang der Wand der Flusskammer können nun zum einen direkt im Mikroskop beobachtet und zum anderen, um eine spätere Datenauswertung zu ermöglichen, durch eine Videokamera auf einen Bildschirm übertragen und per DVD-Recorder aufgezeichnet werden. Durch die verwendete Schwarz und Weiß Kamera werden die Interferenzfarben in einer Grauskala registriert, bei der sich eine Entfernung kleiner als 12nm von der Oberfläche als schwarz widerspiegelt (= Entfernung nullter Ordnung), eine Entfernung größer als 20nm als weiß. Alle Objekte die weiter von der



Oberfläche entfernt sind, verschwinden aus dem Focus. Die Simulation einer physiologischen Strömung wurde durch die Anwesenheit von Erythrozyten gewährleistet, die bei laminarer Strömung zu einer Axialmigration der Erythrozyten und dadurch zu einer Konzentration der Plättchen in den wandnahen Schichten führen.

#### **4.2.3 Videoanalyse**

Die mittels RICM gewonnenen Bilder wurden mit Hilfe der Software MetaMorph (Molecular Devices, Downingtown, PA) derart bearbeitet, dass eine computergestützte Auswertung der aufgezeichneten Flussvideos möglich wurde. Ein großes Problem in der Nachverfolgung der einzelnen Objekte stellte hierbei die Eigenheiten der RICM Technik dar. Die einzelnen Objekte können von Bild zu Bild abhängig von Ihrer Auflagefläche stark in ihrer Größe variieren. Zudem sind die einzelnen Objekte oft inhomogen und teilweise nicht zusammenhängend, so dass in einem ersten Arbeitsschritt der computergestützten Bildauswertung die einzelnen Objekt in binäre Graustufen umgewandelt wurden um anschließend, durch Vergrößerung der Objekte mittels Pixelmultiplikation, eine Vereinigung nicht zusammenhängender Einzelflächen zu einzelnen Objekten zu erreichen, ohne hierbei nicht zusammengehörige Objekte zu verschmelzen. Zudem gelang es, durch Subtraktion eines stationären Hintergrundbildes eine Reduktion des Hintergrundrauschens und eine Egalisierung eventueller Inhomogenitäten der Ausleuchtung des Bildes zu erreichen. Anschließend wurden Parameter definiert, innerhalb derer sich die einzelnen Objekte, in diesem Fall einzelne Plättchen bewegten. Abzugrenzen hiervon waren an der unteren Größengrenze einzelne Tether bzw. einzelne DAP's, die keinem ganzen Plättchen zugehörig waren und zum anderen Konglomerate von mehreren Plättchen, die sich im Fluss- und Rollverhalten von dem einzelner Plättchen unterschieden. Schließlich galt es noch die maximale Distanz festzulegen, die von einem Plättchen innerhalb eines Bildwechsels zurückgelegt werden kann und wie weit es dabei maximal von seiner eigentlichen Bewegungsachse abweicht. Diese zusätzlichen Informationen ermöglichten es sogar solche Objekte weiterzuverfolgen, die für einen kurzen Augenblick aus dem Focus verschwinden. Somit war eine computergestützte Auswertung der Objektbewegung mit Hilfe eines Kurzprogramms zur standardisierten computergestützten Analyse des Bewegungsablaufes möglich. Die folgenden Bilder verdeutlichen die einzelnen Schritte der Bildauswertung:

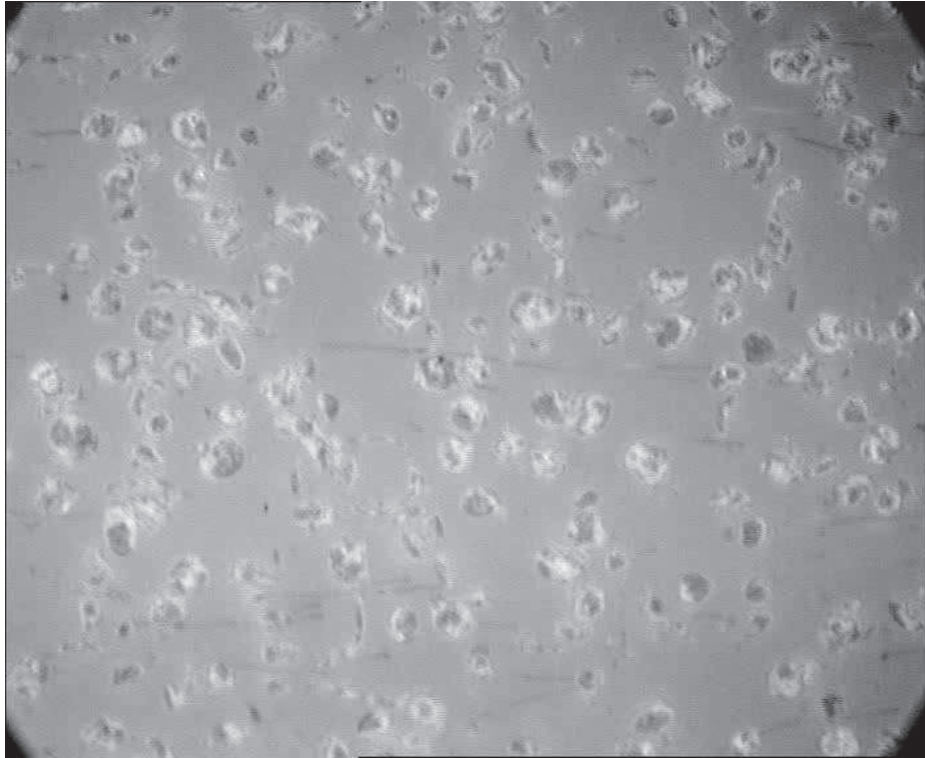


Abbildung 4 – RCM Originalbild aufgezeichnet per DVD Videorecorder. Rekonstituiertes TK über VWF-DA1 Oberfläche mit  $\gamma_w = 10\,000\text{s}^{-1}$ .

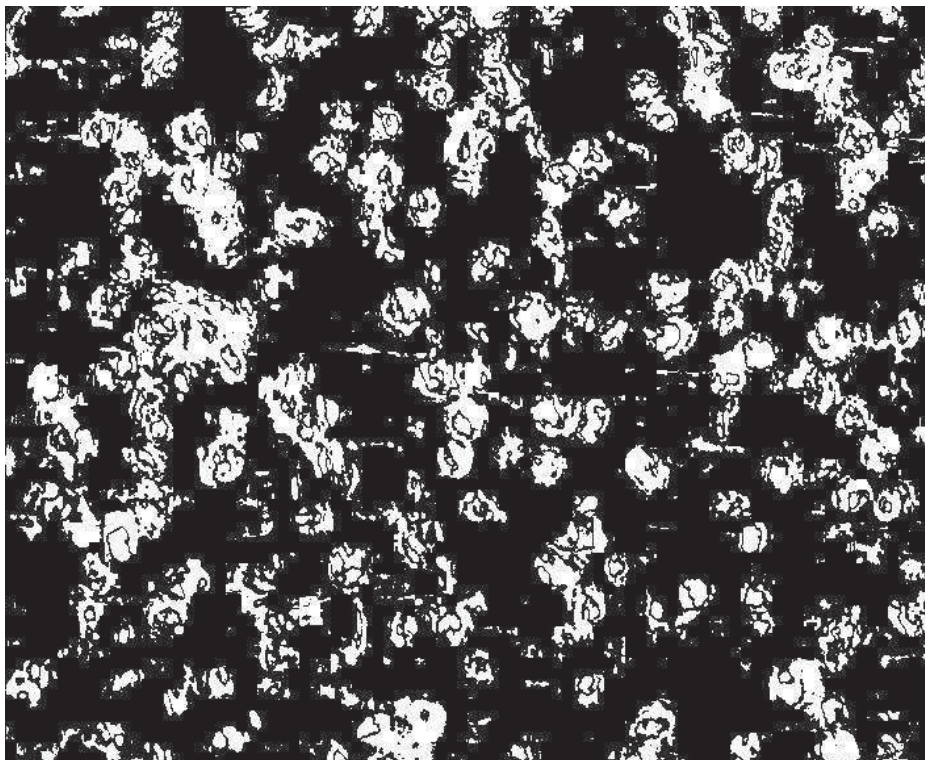


Abbildung 5 – Binäres Bild, stationäres Hintergrundbild subtrahiert

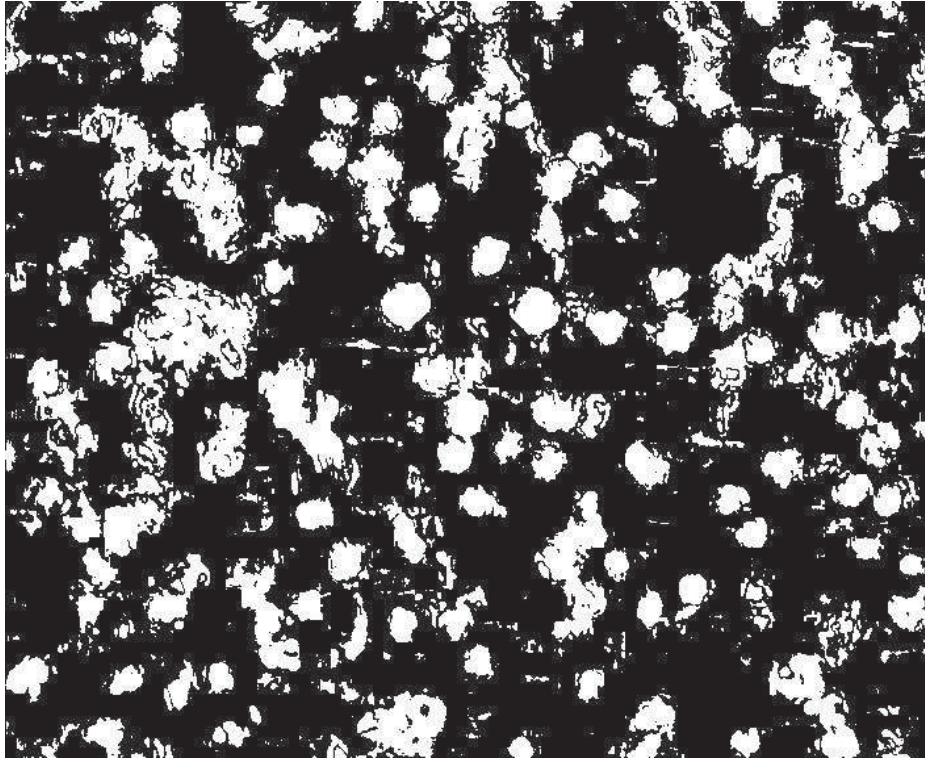


Abbildung 6 – Einzelobjekte vereinigt durch Pixeladdierung

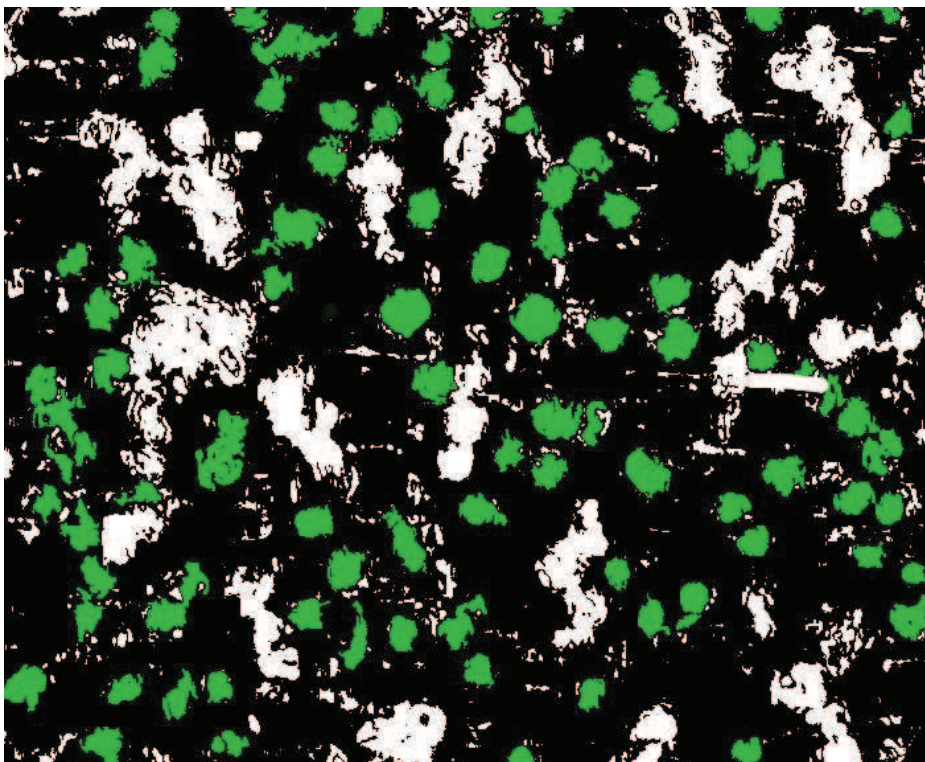


Abbildung 7 – Von der automatischen Datenauswertung erfasste und weiterverfolgte Objekte



Anschließend wurden die so erlangten Daten hinsichtlich verschiedener Gesichtspunkte ausgewertet:

- **Oberflächenbelegung:**

Diese Darstellung gibt wieder, wie groß der Anteil der Oberfläche ist, der während der Perfusion von Plättchen bedeckt wird und erlaubt daher einen Rückschluss auf die Adhäsionsfähigkeit derselben.

- **Rollgeschwindigkeit:**

Diese spiegelt wieder mit welcher Geschwindigkeit ein Plättchen über die Oberfläche wandert. Gemessen wird hier die insgesamt von der ersten Anheftung bis zum Verlassen der sichtbaren Bildfläche zurückgelegte Strecke geteilt durch die Anzahl der sichtbaren Einzelbilder. Die Einheit der Rollgeschwindigkeit ist somit in pixel/frame angeben und kann dann anhand einer Größenskalierung und der verwendeten Bildwiederholungsrate in  $\mu\text{m}/\text{sec}$  umgerechnet werden.

- **Plättchenadhaesionsfläche:**

Da in der RIC-Mikroskopie die Größe eines sichtbaren Objektes durch seine Entfernung von der Oberfläche bestimmt wird, gibt die gemessene Plättchengröße ebenfalls einen Hinweis auf die Adhäsionsfähigkeit der Plättchen.

- **Stationäre Verweilzeit:**

Bevor die Plättchen in ihre Rollbewegung entlang der Oberfläche übergehen sind sie zunächst oft in der Lage am Ort ihrer initialen Anheftung zu verweilen. Diese Zeitspanne von der initialen Anheftung bis hin zu einer Translokation um mehr als die Hälfte ihres Durchmessers wurde bestimmt und gibt somit einen Anhaltspunkt für eine intakte Plättchenfunktion.

Der hier eingesetzte DVD Recorder verwendet das PAL Bildsystem, das theoretisch mit einer Auflösung von 720 x 576 Pixel bei einer Frequenz von 25 Hertz arbeitet. Bedingt durch die mittlere Skalierung liegt die wahre Aufzeichnungsqualität bei 702 x 576 Pixel. Durch die Umrechnung auf quadratische Pixel ergibt sich dann für die Datenauswertung im PC eine endgültige Auflösung 768 x 576 Pixel. Um nun die dargestellten Größeneinheiten in ein reales Größenmaß umzurechnen wurde mit Hilfe eines Maßstabes die Pixelgröße ermittelt.

Der gesamte Bildbereich entsprach bei dem hier verwendeten Lichtweg einer Länge von 82,50µm bei einer Breite von 61,85 µm. Damit ergibt sich für die Länge eines Pixels:

$$\text{Pixellänge} = \frac{82,50\mu\text{m Bildlänge}}{768 \text{ Pixel}} = 0,11\mu\text{m}$$

Für den Flächeninhalt eines Pixels ergibt sich:

$$\text{Fläche } A \text{ eines Pixels} = \frac{\text{Reale Bildfläche}}{\text{Pixelfläche}} = \frac{82,50\mu\text{m} \times 61,85\mu\text{m}}{768 \times 576} = 0,011\mu\text{m}^2$$

Die Rollgeschwindigkeit in Längsrichtung lässt sich folgendermaßen umrechnen:

$$\text{Geschwindigkeit } v = v\left(\frac{\text{Pixel}}{\text{Frame}}\right) \times \frac{0,11\mu\text{m}}{\text{Pixel}} \times 25\text{s}^{-1} = 2,69\frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$$

#### 4.2.4 Kegel-Platte-Rheometer

Das Cone and Plate Rheometer besteht im Wesentlichen aus einer fixierten Platte über der sich ein beweglicher Kegel dreht und somit einen Scherstress auf die zwischen Platte und Kegel befindliche Flüssigkeit ausübt, wie in der folgenden Abbildung veranschaulicht:

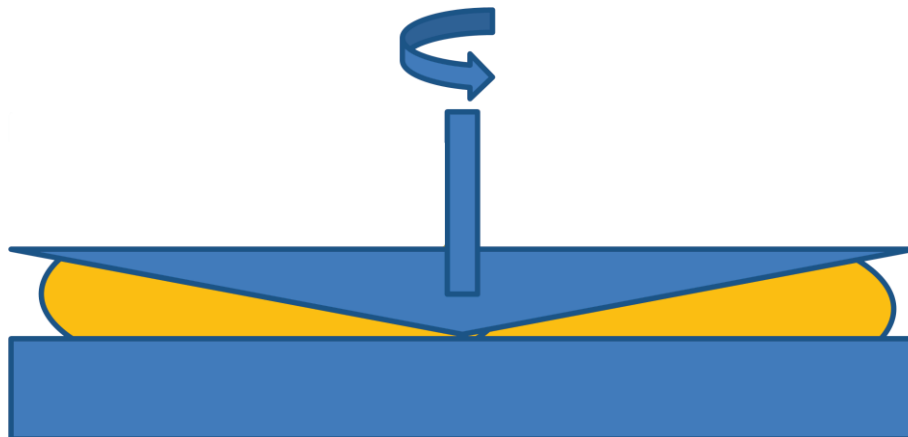


Abbildung 8 - Der Versuchsaufbau besteht aus einer metallischen Platte über der sich ein ebenso metallischer Kegel dreht. Abstand und Drehgeschwindigkeit können elektronisch reguliert werden. Mit Hilfe einer Warmwasserheizung und in der Platte integrierten Wasserkanälen kann die Platte auf 37° Celsius temperiert werden. Zur Probenentnahme kann der Kegel angehoben und die Proben dann mit Hilfe einer Pipette von der Platte abgehoben werden. [58].

Der Abstand des Kegels zur Platte sowie die Drehgeschwindigkeit sind elektronisch regelbar. In dem von mir verwendeten Gerät betrug der Winkel des Kegels  $0,5^\circ$  und der Abstand des Kegels zur Platte  $26\mu\text{m}$  (Haake Rheovisco 1, Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA). Dieser Versuchsaufbau ermöglicht es, die gesamte Flüssigkeit unterhalb des Kegels mit der identischen Scherungsrate zu scheren. Die Platte wurde auf  $37^\circ$  Celsius temperiert um physiologische Bedingungen zu simulieren und somit temperaturabhängige koagulatorische Effekte zu verhindern. Während der Scherung wurde kontinuierlich die Viskosität der gescherten Probe gemessen. Hierdurch war es möglich, Rückschlüsse auf etwaige Fehlerquellen wie z.B. eingeschlossene Luft oder aber zu geringe Antikoagulation und damit verbundene Gerinnselbildung zu ziehen. Eine etwaige Kontaktaktivierung der Plättchen durch die Metalloberflächen wurde durch Verwendung von Corn Trypsin Inhibitor (CTI; Calbiochem, La Jolla, CA) ausgeschlossen. Bei den Kegel-Platte-Experimenten kam PRP zum Einsatz um die bei der Scherung von Vollblut unumgängliche Hämolyse zu vermeiden. Zudem wurde Apyrase und Prostaglandin  $E_1$  zugegeben, um eine Aktivierung der Plättchen zu verhindern. Nach Applikation des Scherstressess wurde der Kegel angehoben und die gescherte Flüssigkeit zur weiteren Analyse entnommen.

Alle Versuche wurden doppelt durchgeführt und das gescherte PRP wurde gepoolt, um ein ausreichendes Testvolumen für die Durchflussszytometrie und für den Thrombin Generierungs Test zu gewährleisten.

#### **4.2.5 Durchflussszytometrie**

Für die Rezeptor- und Aktivierungsanalyse der Mikropartikel und Thrombozyten wurde ein Durchflussszytometer (Coulter Epics XL, Beckman Coulter, Fullerton, CA) verwendet. Das Prinzip der Durchflussszytometrie besteht darin, dass ein mit einem fluorochromen Farbstoff markiertes Teilchen mit Hilfe eines laminaren Flüssigkeitsstromes durch den Anregungslaserstrahl geführt wird. Der laminare Flüssigkeitsstrom entsteht, indem die Probensuspension durch Unterdruck angesaugt wird und vor und innerhalb der Messzelle von einer schneller fließenden isotonen Trägerflüssigkeit umhüllt wird (Sheath Fluid), wodurch eine Separation der zu analysierenden Zellen erreicht wird. In der Messzelle wird jede passierende Zelle nun von einem Laser mit der Wellenlänge  $488\text{nm}$  durchleuchtet und der gebundene fluoreszenzmarkierte Antikörper wird hierdurch zur Aussendung von Licht

diskreter Wellenlänge angeregt. Dieses wird entsprechend seiner Wellenlänge von dichromen Spiegeln umgelenkt und dann nach der Passage eines Bandpassfilters von verschiedenen Detektoren registriert und in ein elektrisches Signal umgewandelt. In dem von mir verwendeten Gerät sind vier verschiedene Detektoren verbaut, so dass eine Differenzierung von bis zu vier verschiedenen Oberflächenmarkern gleichzeitig möglich wird.

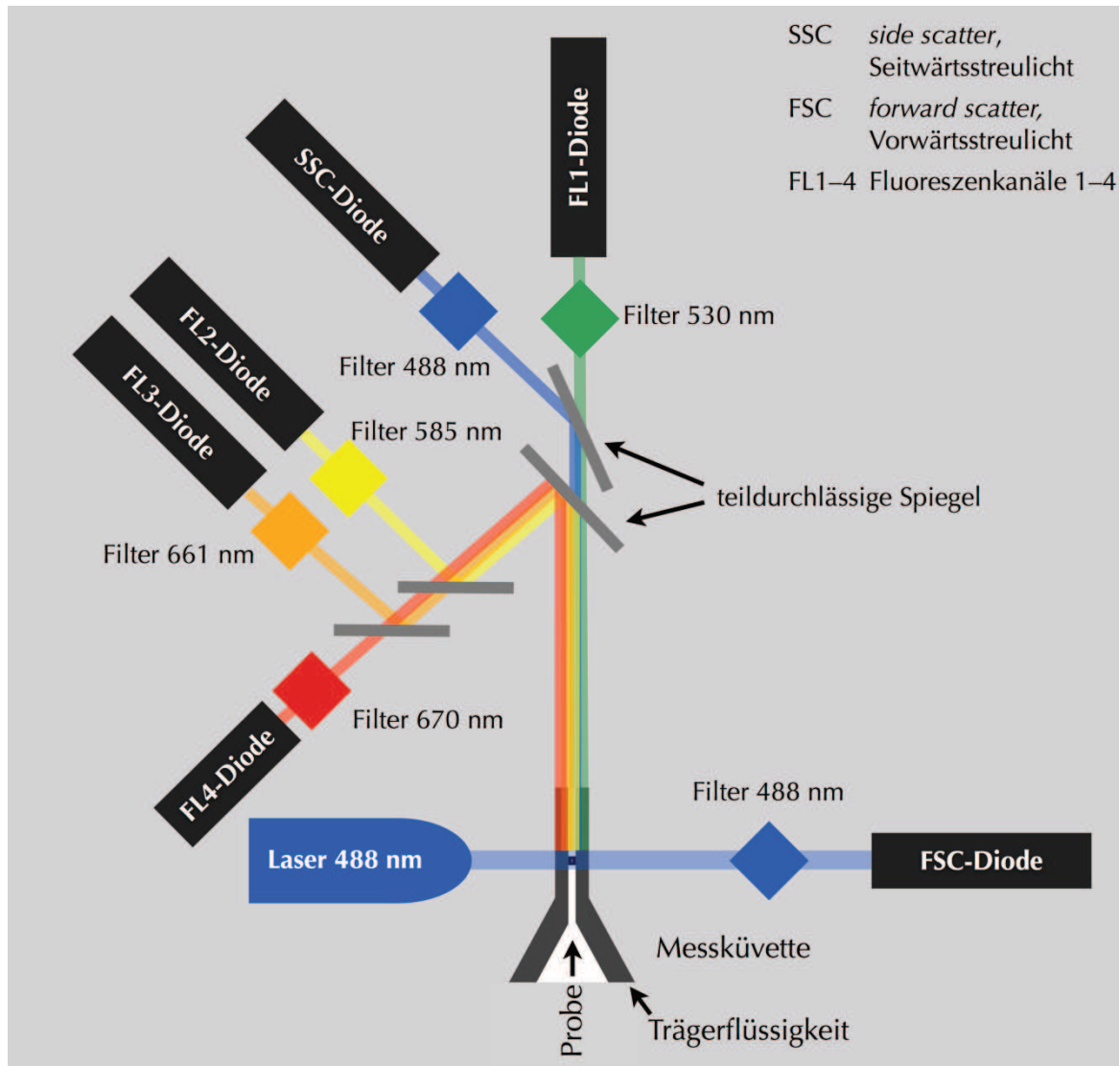


Abbildung 9 - Funktionsweise Durchflusszytometer: Ein Laser der Wellenlänge 488nm trifft auf einzelne Objekte, die umhüllt von Trägerflüssigkeit den Strahl passieren. Anhand des hierbei absorbierten Lichtes wird der Forward scatter bestimmt. Ein Teil des Lichtes wird abgelenkt und passiert Umlenkungsspiegel sowie Filter mit verschiedener Bandweite, so dass eine Aufteilung des reflektierten oder emittierten Lichtes gemäß seiner Wellenlänge möglich wird. Mit Hilfe von Bildverstärker Röhren wird das Lichtsignal in ein elektrisches Signal umgewandelt und eine digitale Verarbeitung ermöglicht[59, 60].

Somit sind detaillierte Aussagen zu Oberflächenmarkern der gemessenen Teilchen möglich. Der Teil des Laserlichts, der durch die Teilchen zu einer Vorwärtsstreuung führt, erlaubt einen Rückschluss auf die Größe der gemessenen Teilchen (FSC). Normalerweise wird dieses Signal als Auslösemechanismus für die Teilchenmessung verwendet (Trigger: FSC). Da in meinem Fall jedoch Teilchen unterhalb der optischen Auflösungsgrenze nicht erfassbar wären, wählte ich einen optischen Kunstgriff: In meinen Experimenten wurde das Fluoreszenzsignal im ersten Kanal als Auslösesignal gewählt (Trigger: FL1). Somit konnten Mikropartikel bis zu einer Größe von 100 Nanometern Durchmesser sicher detektiert werden. Die Proben wurden hierzu mit folgenden FITC-Anikörpern markiert: CD 41, CD 42b, CD 62P oder der entsprechenden IgG Kontrolle. Um sowohl eine Kontrolle der Zellherkunft als auch des Membranzustandes gleichzeitig zu ermöglichen wurden die Proben mit CD 41 FITC und Annexin V PE-Cy5 markiert. Ein positives Signal in beiden Fluoreszenzkanälen beweist nun durch das positive FL-1 Signal die Plättchenherkunft, da Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  (CD 41-Marker) zu den häufigsten Glycoproteinen auf Plättchenmembranen zählt, und darüber hinaus durch das positive FL-4 Signal des Annexin Markers auch das Vorhandensein von Phosphatidylserin auf den Thrombozyten, die auf eine aktivierte Membranoberfläche schließen lassen. Der zusätzlich applizierte Fluoreszenzfarbstoff wurde hier bewusst im 4. Kanal gewählt um einen möglichst großen Abstand zwischen den emittierten Wellenlängen der beiden Fluorochrome zu gewährleisten und damit das Risiko eines Überstrahlens in den benachbarten Fluoreszenzkanal von vornherein und ohne die Notwendigkeit einer Kompensation auszuschließen.

Die per durchflusszytometrische Analyse gewonnenen Daten wurden am PC mittels Flow Jo Software aufbereitet. Flow Jo ermöglicht ein nachträgliches *Gating*, also eine Einteilung der gemessenen Ergebnisse in Untergruppen wie z.B. Plättchen und Mikropartikel. Die Gates wurden anhand von fluoreszierenden Normpartikeln (*gating beads*) definiert. Hierzu wurde Alexa-488 markierte Mikrosphären mit einem Durchmesser von 0,1 $\mu\text{m}$  verwendet (Molekular Probes Europe, Leiden, Niederlande).

#### **4.2.6 TDT-Test**

Der TDT-Test (*Thrombin Dynamics Test*) erlaubt eine kinetische Quantifizierung der initialen Thrombin Bildung auf dem extrinsischen Weg. Durch die Serinprotease Thrombin wird



Fibrinogen zu Fibrinmonomeren gespalten und zusätzlich werden durch eine Aktivierung des Faktor XIII die entstandenen Fibrinmonomere kovalent verknüpft, wodurch sich ein quervernetzter, stabiler Fibrinthrombus ausbilden kann. Zusätzlich fungiert Thrombin durch seine mannigfaltigen Rückkopplungsmechanismen als ein Potentator und Beschleuniger der Blutgerinnung (z. B. über die Aktivierung von Faktor VIII und Faktor V), wie bereits im vorhergehenden Abschnitt erläutert. Bisher war die Thrombin-Generierung in vitro nur mit Hilfe von statischen Systemen nachweisbar, die es erlaubten, eine langsame Thrombingenerierung (d.h. eine Thrombinentstehung innerhalb ca. einer Stunde) sichtbar zu machen. Die Verwendung des TDT Test ermöglicht es, die physiologisch viel bedeutsamere schnelle Thrombingenerierung zu untersuchen und die Dynamik dieses Prozesses zu quantifizieren. Hierzu wird die Extrinsische Gerinnungskaskade durch einen Kontaktaktivator in Gang gesetzt. Dabei handelt es sich zum Einen um schon vorab in der Probe vorhandene aktivierte Oberflächen bzw. exprimierten TF und zum Anderen um zusätzlich exogen zugesetztes Thromboplastin. Als Probematerial kam in der vorliegenden Arbeit sowohl PPP als auch PRP zum Einsatz. Der Test wurde mit Hilfe eines automatisierten Gerätes durchgeführt (ACL 9000, Instrument Laboratory, Barcelona, Spanien) und die dabei erhobenen Absorptionsdaten auf Diskette gespeichert. Die Einleitung der Gerinnungsreaktion erfolgte durch Recalcifizierung mit 25 mM  $\text{CaCl}_2$ . Oft reichte die Menge der aktivierten Oberflächen alleine noch nicht aus um die Reaktion in Gang zu bringen, was wiederum die zuvor erwähnte Zugabe von geringen Mengen an Thromboplastin erforderte. Der Ablauf der extrinsischen Gerinnungskaskade führte zur Umwandlung des chromogenen Substrats  $\text{H-D-CHG-Ala-Arg-pNA} \cdot 2\text{AcOH}$  ( $K_M = 15,9 \mu\text{M}$ ) durch das gebildete Thrombin und hierdurch zur Freisetzung von p-Nitroanilin, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 405nm kontinuierlich gemessen werden konnte. Die Zugabe eines Fibrin- Inhibitors ( $\text{H-Gly-Pro-Arg-Pro-OH} \cdot \text{AcOH}$ ) verhinderte hierbei die Bildung eines Fibrin Gerinnsel, wodurch eine störungsfreie optische Messung ermöglicht wurde. Anschließend war eine computergestützte Auswertung hinsichtlich zweier Parameter möglich:

- Zum einen ließ sich die Zeit bis zum Erreichen der Maximalen optischen Dichte bestimmen. Diese wird als *Time to Peak* bezeichnet
- Zum anderen war es durch die kontinuierliche Messung möglich, die maximale Geschwindigkeit des Substratabbaus zu ermitteln, die dem steilsten Punkt der ersten

Ableitung der Thrombingenerierungskurve entspricht. Der hierbei bestimmte Wert wird als die Thrombin Dynamik bezeichnet und ihr Wert wird in mE/s bzw. in % des Normalwertes ausgedrückt

Einfluss auf das Ergebnis hat nicht nur die in der Probe enthaltene Menge an aktivierten Membranen sondern ebenfalls die Konzentration der Gerinnungsfaktoren. Der Einfluss der Gerinnungsfaktoren auf die Thrombin Dynamik ist in folgender Tabelle dargestellt. Ebenfalls aufgeführt sind die Halbwertszeiten der aufgeführten Faktoren.

**Tabelle 1: Einfluss der Gerinnungsfaktoren auf die Thrombin Dynamik**

Exemplarische Darstellung des Einflusses der Konzentration verschiedener Gerinnungsfaktoren auf die Thrombin Dynamik. Die Werte wurde durch schrittweise Verdünnung von ISTH Normplasma mit Mangelplasma, bei dem einzelne Gerinnungsfaktoren durch Immundepletion entfernt wurden, ermittelt. Aufgeführt ist die maximale Steigung der Thrombingenerierungskurve (MAX) in mE/s. Den größten Einfluss auf die Thrombingenerierung zeigt wie zu erwarten der Gehalt an Prothrombin [61]

Faktoraktivität	HWZ(h)	50%	25%	12,5%	6,3%	3,1%	1,6%	0,8%
F II	100	106	92	62	42	31	20	14
F V	12	123	111	92	74	62	51	40
VIII	12	109	104	89	84	77	76	72
FX	40	105	91	80	67	61	55	44

Da im Rahmen der Kegel-Platte Experimente aber nur ein Vergleich zwischen behandelten und unbehandelten Proben desselben Spenders zum gleichen Zeitpunkt angestellt wurde, konnte dieser Punkt in der folgenden Betrachtung vernachlässigt werden.

#### 4.2.7 Thrombozytenaggregometer Multiplate®

Um die Thrombozytenaggregation zu bestimmen wurde das Multiplate®-System (= Multiple Platelet Funktion Analyzer) der Firma Dynabyte Medical (München, Deutschland) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine neuartige Methode der Thrombozytenfunktionsdiagnostik, die ihre Grundlagen in der von Cardinal und Flowers eingeführten Impendanzaggregometrie der 80er Jahre hat[62]. Das System beruht darauf, dass unter Normalbedingungen Thrombozyten in nicht aktiviertem Zustand vorliegen und somit keine Neigung zur Aggregation zeigen. Kommt es nun jedoch zu einer Aktivierung der Thrombozyten, exponieren diese an ihrer Oberfläche Adhäsionsmoleküle die zu einer Anheftung an Gefäßwandverletzungen oder eben an den Sensordrähten der Messküvette führen. Diese Aggregation an der Oberfläche der Messdrähte simuliert den physiologischen Vorgang der Plättchenadhäsion gefolgt von Aggregation an Oberflächen und hat somit Vorteile gegenüber der Aggregationsmessung in Lösung. Die Plättchenablagerung an den Sensordrähten führt zu einer Zunahme des elektrischen Widerstandes (Impedanz) zwischen den beiden Sensordrähten der Messzelle[63]. Die Funktionsweise der Multiplate Analyse soll von der folgenden Abbildung verdeutlicht werden:

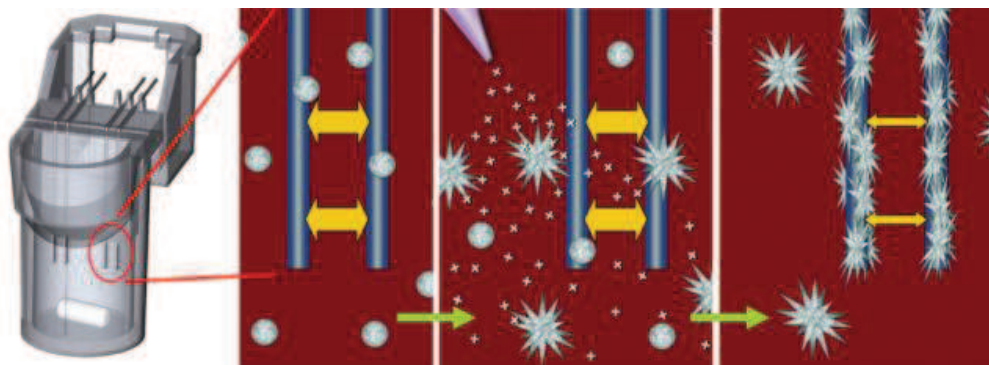


Abbildung 10 –Links ist die Messküvette dargestellt in der Probe und Testreagenz durch einen Magnetrührer vermischt werden. In den folgenden drei Bildern werden die Vorgänge innerhalb der Messzelle verdeutlicht. Zunächst befinden sich die Plättchen in einem unaktivierten Zustand, somit findet keine Interaktion mit den Messelektroden statt. Nach Zugabe der Testreagenz werden die Plättchen aktiviert und aggregieren auf den Messelektroden. Hierdurch wird eine Impedanzänderung ausgelöst ([64])

Diese Veränderung kann über einen beliebigen Zeitraum gemessen werden und lässt dadurch Rückschlüsse über die Geschwindigkeit sowie über die insgesamt vorhandene Kapazität der Plättchen zur Aggregation zu. Normalerweise wird der Test mit Vollblut

durchgeführt, da Erythrozyten für die Impedanzmessung unerheblich sind. In meinem Fall wurde für den Test PRP bzw. TK verwendet, wie auch von anderen Autoren beschrieben[65].

Die Aktivierung der Thrombozyten kann hierbei durch verschiedene Stimulanzen geschehen und zeigt somit unterschiedliche funktionelle Aspekte der Thrombozyten auf. Hier wurde eine Stimulierung durch Kollagen gewählt. Eine Stimulation durch Ristocetin erschien nicht sinnvoll, da das Ergebnis von der in der Suspension vorhandenen Menge an VWF abhängt und dessen Aktivität im Laufe der Lagerungszeit konstant abnimmt. Die Ergebnisse wären somit nicht vergleichbar gewesen.

Ein Vorteil des verwendeten Multiplate® Systems liegt darin, dass durch die Verwendung von zwei Sensorenpaaren pro Messzelle automatisch eine interne Validierung des gemessenen Wertes erfolgt, indem der Korrelationskoeffizient der gemessenen Impedanzwerte ermittelt wird und die beiden Flächen unter der Aggregationskurve (AUC) verglichen werden. Die gemessene Impedanzänderung wird fortlaufen aufgezeichnet und anschließend gegen die Zeit aufgetragen, wodurch eine Auswertung hinsichtlich folgender Gesichtspunkte möglich wird:

- Fläche unter der Kurve = *Area under the curve* (AUC): Diese gibt das Gesamtaggregationspotential der Thrombozytensuspension wieder
- Aggregationseinheiten = *Aggregation Units* (AU): Frei gewählte Maßzahl zur Wiedergabe der Impedanzänderung
- Geschwindigkeit = *Velocity*: Diese gibt die Geschwindigkeit mit der die Aggregation stattfindet in der Einheit AU/min

Die Bedeutung der ermittelten Messwerte wird von der folgenden Illustration graphisch verdeutlicht:

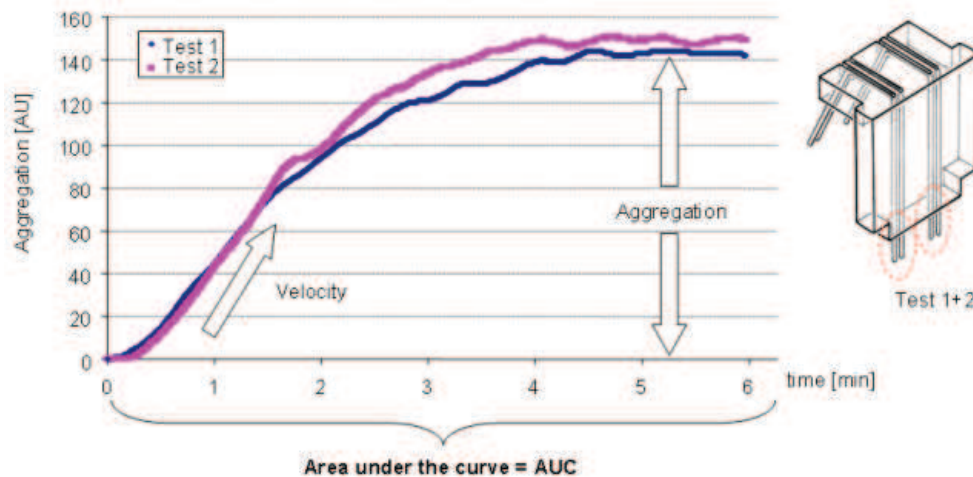


Abbildung 11 – Graphische Darstellung der Multiplate Analyse: Die beiden Kurven zeichnen die von zwei unabhängigen Messelektrodenpaaren ermittelte Impedanzänderung auf. Diese wird in frei gewählten Aggregationseinheiten (AU) wiedergegeben und gegen die Zeit aufgetragen. Die Steilheit der Kurve bestimmt die Geschwindigkeit der Aggregation, die Fläche unter der Kurve das Gesamtpotential. Rechts Darstellung der Messküvette mit den beiden unabhängigen Messelektrodenpaaren ([64]).

#### 4.2.8 Statistische Auswertung

Die hier aufgeführten Daten werden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD) bzw.  $\pm$  Standardfehler (SEM) wiedergegeben. Ein Vergleich zwischen 2 Gruppen wurde mit Hilfe des Student-T-Testes durchgeführt. Ein Pearson Koeffizient  $p < 0,05$  wurde dabei als statistisch signifikant betrachtet.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Scherungsinduzierte Generierung von Mikropartikeln im Kegel-Platte-Rheometer

Die Scherung von PRP im Kegel-Platte-Rheometer führt zu einer starken Generierung von Mikropartikeln. Die Zahl der generierten MP steigt exponentiell an, sobald eine Scherrate von  $\gamma_w = 6000s^{-1}$  überschritten wird. Als Negativkontrolle wurde über einen identischen Zeitraum bei  $\gamma_w = 10s^{-1}$  geschert, um eventuelle Einflüsse durch die scherungsunabhängige Prozedur der Probenapplikation und -entnahme auszuschließen. Der Anstieg der MP Zahl in der durchflusszytometrischen Analyse war abhängig vom verwendeten Spenderblut

unterschiedlich stark ausgeprägt und bewegte sich bei einer Messung von PRP zwischen einem 10- und 30-fachen Anstieg wie die folgende Graphik verdeutlicht:

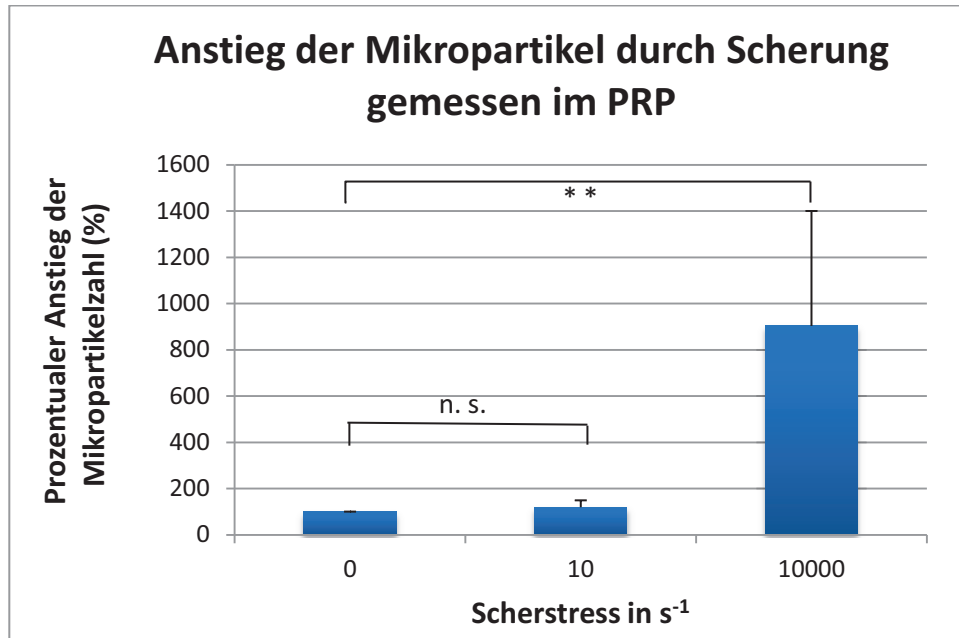


Abbildung 12 – Anstieg der MP durch Scherung von Citrat antikoaguliernem PRP bei  $\gamma_w = 10\,000\,s^{-1}$ : Die Abbildung gibt den Anstieg der Mikropartikel im Vergleich zu einer ungescherten Probe wieder. Während bei einer Scherung mit  $10\,s^{-1}$  die Anzahl der MP nahezu konstant zum Ausgangswert bleibt ( $\sigma$  = ungescherte Probe = 100 %), ergibt sich nach Scherung mit  $10\,000\,s^{-1}$  eine Verzehnfachung der Mikropartikelzahl (MW $\pm$ SD; n=8).

Dieser Effekt war sowohl bei Antikoagulation mit P-PACK nachweisbar, als auch und hier sogar stärker ausgeprägt bei einer Antikoagulation mit Citrat. In der durchflusszytometrischen Analyse zeigte sich eine ausgeprägte Phosphatidylexpression auf der Oberfläche der neu entstandenen Mikropartikel. Die Zugabe von CTI führte zu keiner messbaren Änderung der Mikropartikelgenerierung oder der Oberflächenaktivierung. Ebenfalls ergab sich bei Blockade des Integrin  $\alpha IIb\beta 3$ -Rezeptors durch Tirofiban keine nennenswerte Änderung der durch die Scherung resultierenden MP-Zahl. Die Wirksamkeit dieser Blockade bei der eingesetzten Konzentration an Tirofiban wurde mittels Multiplate Analyse nachgewiesen und führte hier zu einem vollständigen Ausbleiben der Aggregation. Eine Erhöhung der Tirofiban Konzentration führte sogar zu einer geringfügigen Erhöhung der MP Zahlen bei Verwendung von P-Pack antikoaguliernem Blut. Bei Zugabe von NMC-4, einem gegen die A1 Domäne des von Willebrand Faktor gerichteten Antikörpers, trat hingegen

eine nahezu vollständige Blockade der Mikropartikel Entstehung ein. Die blockierende Wirkung von NMC-4 war bei einer Konzentration von 10 $\mu$ g/ml bereits maximal ausgeprägt, eine Erhöhung auf 20  $\mu$ g/ml brachte keinen weiteren Effekt. Der gemessene Trend zeigte sich bei der Analyse von PPP nach der Scherexposition umso deutlicher. So war hier bei der Messung der gescherten Probe im Vergleich zur ungescherten Probe ein 55-facher Anstieg der MP Anzahl zu verzeichnen. Im Folgenden dargestellt sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen an geschertem PRP sowie der Effekt der Blockade der VWF-GpIb Interaktion durch Zugabe von NMC-4 wie sie 2006 in Blood publiziert wurden[33]:

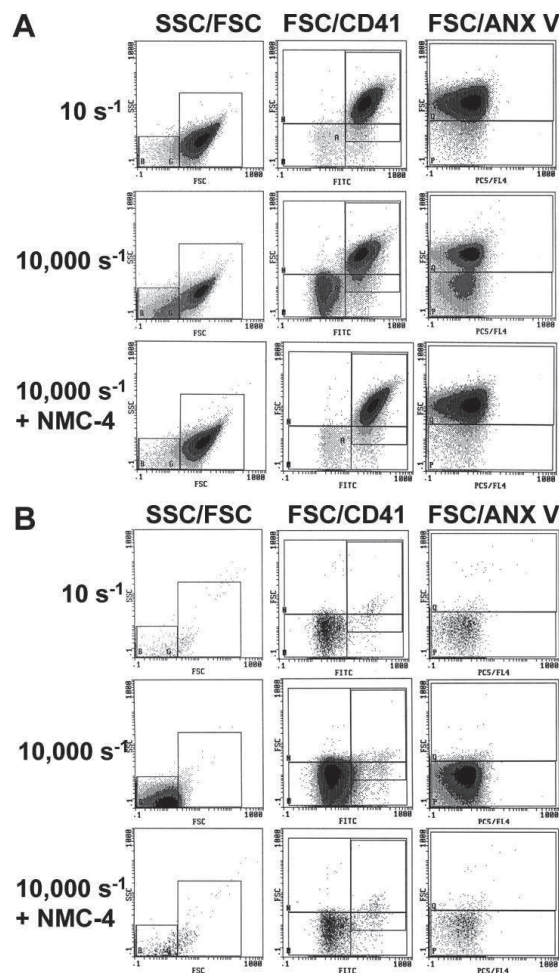


Abbildung 13 – Abhängigkeit der Mikropartikelgeneration von der GPIb-VWF Interaktion: Durchflusszytometrische Analyse von 3 verschiedenen Proben (Scherrate 10s<sup>-1</sup>, 1000s<sup>-1</sup> und 10000s<sup>-1</sup> + NMC-4), zunächst gemessen im PRP (A), dann nach Zentrifugation gemessen in PPP (B). Die Proben wurden zum einen mit einem CD 41 FITC - AK (FL-1) markiert um deren Ursprung von Blutplättchen zu beweisen, zum anderen mit Annexin V PE-Cy5 (FL-4) um eine Membranaktivierung nachzuweisen. Durch die Scherung kommt es zu einem deutlichen Anstieg der MP-Zahlen, der in

der Messreihe mit PPP noch deutlicher ausfällt. Diese neu entstandenen MP exprimieren Phosphatidylserin an ihrer Oberfläche. Durch die Zugabe der VWF blockierenden Antikörpers NMC-4 wird dieser Effekt völlig unterbunden[33].

Das folgende Diagramm setzt die oben exemplarisch aufgeführten Experimente graphisch um und verdeutlicht, dass nicht nur eine sehr große Zahl an thrombozytären Mikropartikel durch die Scherung entsteht, sondern dass diese auch eine deutliche Phosphatidylserinexpression an Ihrer Oberfläche zeigen:

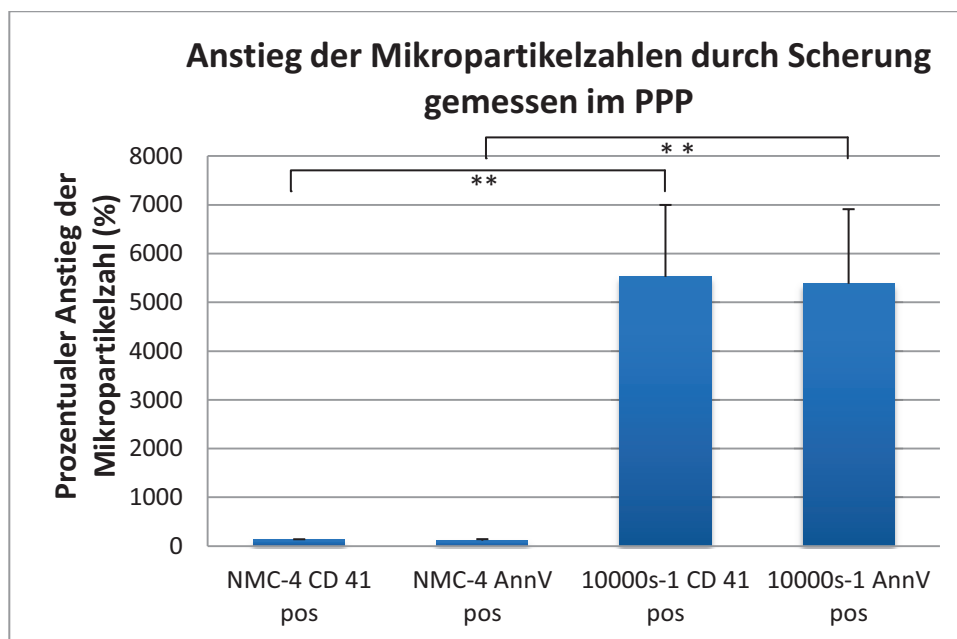


Abbildung 14 – Anstieg der MP gemessen im PPP: Die Messungen ergaben hier sowohl für die Messung des Annexin V Signals als auch für den CD 41 - AK eine mehr als 50 fache Zunahme der Mikropartikel nach Scherung. Wurde dagegen vor der Scherung der v-WF blockierende Antikörper NMC-4 zugegeben, so war der scherinduzierte Effekt völlig aufgehoben und die Zahl der Mikropartikel verharrte auf dem Niveau einer unbehandelten Probe. Alle dargestellten Proben wurden im Kegel-Platte-Rheometer mit  $10\,000\text{s}^{-1}$  geschert (MW $\pm$ SD; n=5).

Im anschließend durchgeführten TDT Test ergab sich als Folge der Scherung eine deutliche Verkürzung der Gerinnungszeit, die sowohl im PRP als auch im PPP nachweisbar war. Die Thrombin Generierung erfolgte spontan durch Rekalzifizierung, es war hier keine Zugabe von exogenem Tissue Faktor zur Initiierung der Thrombin-Entstehung notwendig.



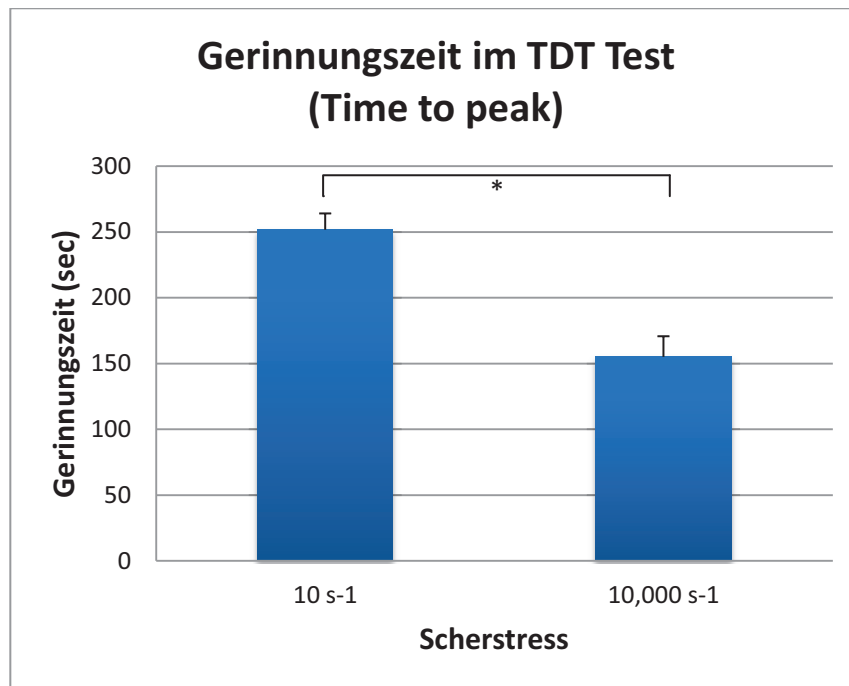


Abbildung 15 – Einfluss der MP auf die Thrombin Generierungszeit: Dieser Test wurde mit PPP durchgeführt und vergleicht die Thrombingenerierung einer für 3 min bei 10 000s<sup>-1</sup> gesicherten Probe mit der einer über ebenfalls 3 min bei 10s<sup>-1</sup> gesicherten Referenzprobe. Es zeigt sich eine deutliche Verkürzung der Thrombin Generierungszeit (Time to peak) durch die Scherung (MW±SD; n=5).

## 5.2 Einfluss der Lagerungsdauer auf Thrombozytenkonzentrate

### 5.2.1 Videoanalyse der Flusskammerexperimente

Alle Perfusionsexperimente wurden bei einer Scherrate von  $\gamma_w = 10\,000\text{s}^{-1}$  über eine mit 10µg/ml VWF-DA1 beschichtete Oberfläche durchgeführt. Die Vorbereitung der untersuchten Proben erfolgte wie unter Material und Methoden beschrieben. Pro Einzelversuch wurde jeweils ein 15 Sekunden dauernder Videoausschnitt ca. 1 min nach Start der Perfusion ausgewertet. Aufgrund des verwendeten PAL-Videosystems ergibt sich damit eine Gesamtzahl von 375 ausgewerteten Einzelbildern pro TK und Versuchstag.

$$\text{Einzelbildanzahl} = 25 \frac{\text{Einzelbilder}}{\text{sec}} * 15\text{sec} = 375 \text{ Einzelbilder}$$

Die Anzahl der hierbei nachverfolgten Einzelobjekte zeigte sich innerhalb der verschiedenen TK relativ konstant und schwankte zwischen  $3096 \pm 254$  Objekten an Tag 0 und  $2506 \pm 352$  Objekten an Tag 7 (n=7).

### 5.2.1.1 Abhängigkeit der thrombozytären Oberflächenbelegung von der Lagerungsdauer der TK

Die gesamte von Plättchen bedeckte Oberfläche im Sichtfeld der Videokamera reduzierte sich im Laufe der 7 täglichen Lagerungsdauer stetig. Während am Tag 0 noch  $100\,500 \pm 16\,219$  Pixel von Plättchen bedeckt waren, reduzierte sich dies bis zum Tag 7 auf  $68\,040 \pm 14\,624$  Pixel. Relativ zur Gesamtoberfläche reduzierte sich somit die Oberflächenbelegung von 23% am Abnahmetag auf 15% an Tag 7. Innerhalb von sieben Lagerungstagen entspricht dies somit einem Rückgang um 35% gegenüber dem Ausgangswert.

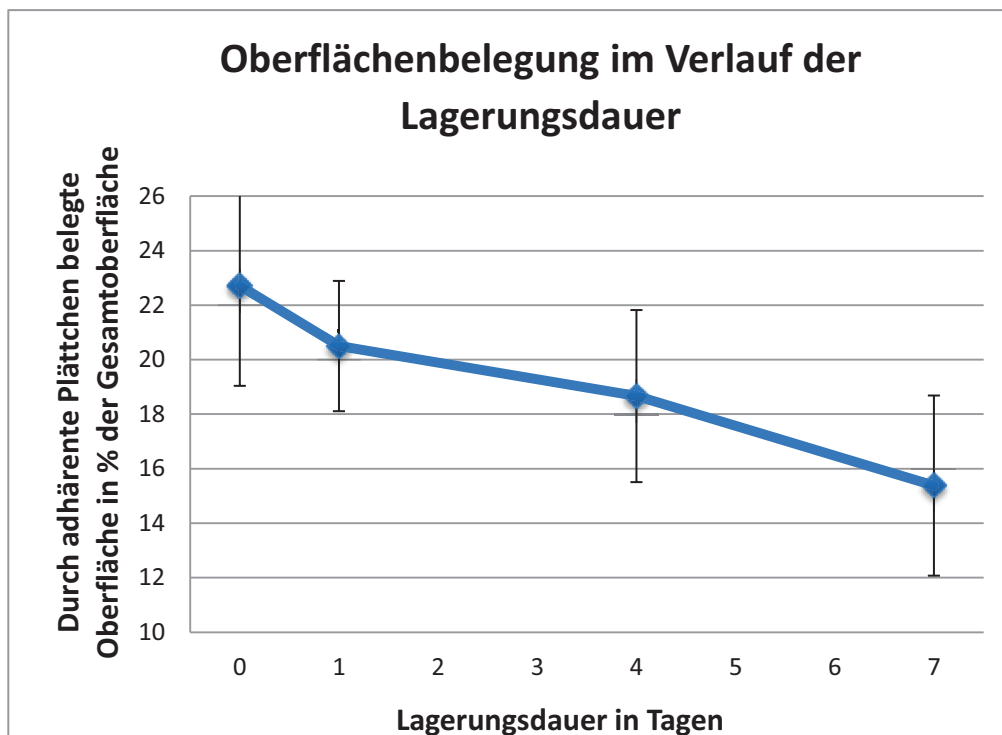


Abbildung 16 – Oberflächenbelegung als Anhaltspunkt für die Adhäsionsfähigkeit: Wiedergegeben ist die Bedeckung der VWF-DA1 Oberfläche durch adhärenzte Plättchen. Die angegebenen Werte geben die prozentuale Bedeckung der VWF-DA1 Oberfläche innerhalb der 7 täglichen Lagerungsdauer wieder. Die Werte stellen den MW ± SD aus 7 gemessenen TK dar

### 5.2.1.2 Abhängigkeit der Plättchenadhäsionsfläche von der Lagerungsdauer der TK

Im vorhergehenden Absatz wurde bereits gezeigt, dass die Oberflächenbelegung im Laufe der Lagerungsdauer der TK rückläufig war. Dies kann zum einen daraus resultieren, dass

weniger Plättchen in der Lage sind sich an der Oberfläche anzuheften, das heißt die Zahl der Objekte und somit auch deren Gesamtfläche sinkt. Zum anderen könnte das Ergebnis dadurch erklärt werden, dass die einzelnen an der Oberfläche anhaftenden Plättchen im Vergleich zum Versuchsbeginn an Auflagefläche verlieren. Es zeigt sich, dass beide Ursachen zutreffen. So sank die Zahl der an der Oberfläche adhärennten Plättchen von ... Ebenso nahm die Größe der dargestellten Plättchen ab. Lag die Kontaktfläche eines Einzelplättchens am Tag 1 noch bei 425 Pixeln (SD +/-17) bzw.  $4,9 \mu\text{m}^2$ , sank sie im Laufe der Versuchswoche auf ca. 381 (SD +/-17) Pixel bzw.  $4,38 \mu\text{m}^2$ .

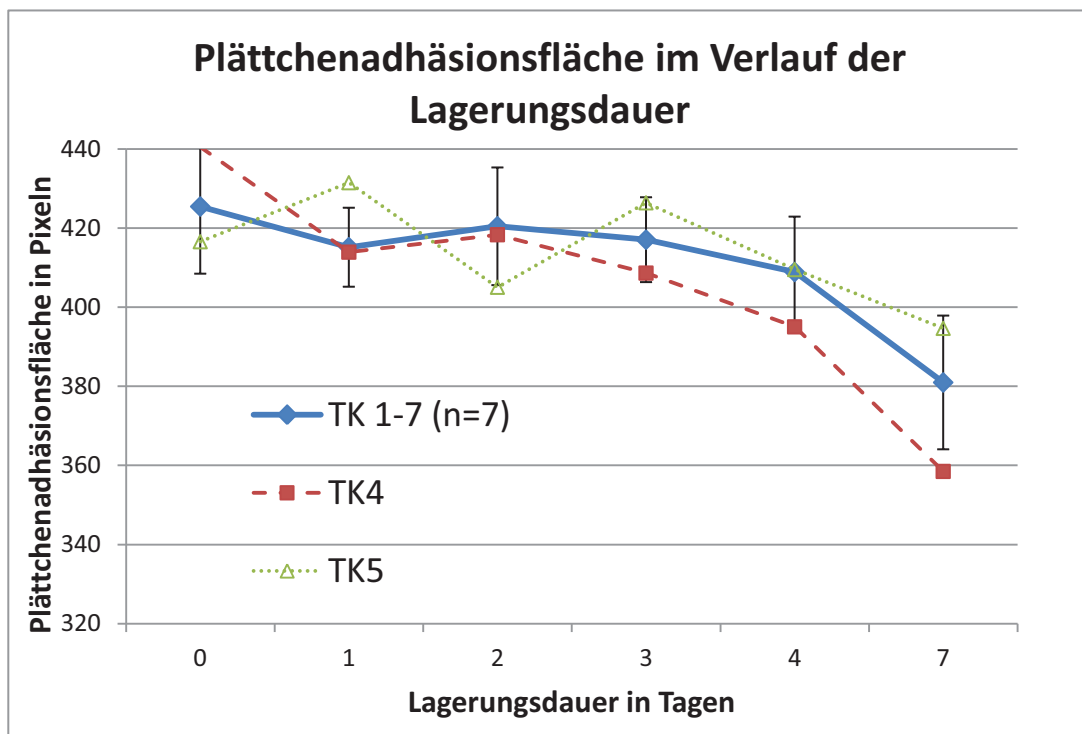


Abbildung 17 – Auflagefläche der einzelnen Plättchen im Verlauf der 7 tägigen Lagerungsdauer. Die anhand der Metamorph Analyse errechnete Auflagefläche der adhärennten Plättchen bei einer Perfusion über eine VWF-dA1 beschichtete Oberfläche mit  $\gamma_w = 10\,000\text{s}^{-1}$  reduziert sich im Verlauf der Lagerungsdauer um ca. 10% ( $n=7 \pm \text{SD}$ ). Dabei fällt der Abfall der Adhäsionsfähigkeit in den gemessenen TK unterschiedlich stark aus. Exemplarisch aufgeführt sind hier die Messwerte von TK 4 und TK 5.

### 5.2.1.3 Änderung der Verweilzeit der Thrombozyten am Punkt der initialen Adhäsion

Für die Bestimmung der Verweilzeit der Thrombozyten auf der überströmten Oberfläche wurden insgesamt 21 681 Einzelplättchen am Abnahmetag und 18 396 Plättchen an Tag 7 analysiert. Zwischen 33 und 43 % der Plättchen waren nur für ein oder zwei Einzelbilder auf der Oberfläche sichtbar. Die Verteilung der Arrestzeiten war innerhalb der untersuchten TK relativ homogen wie die folgende Grafik verdeutlicht:

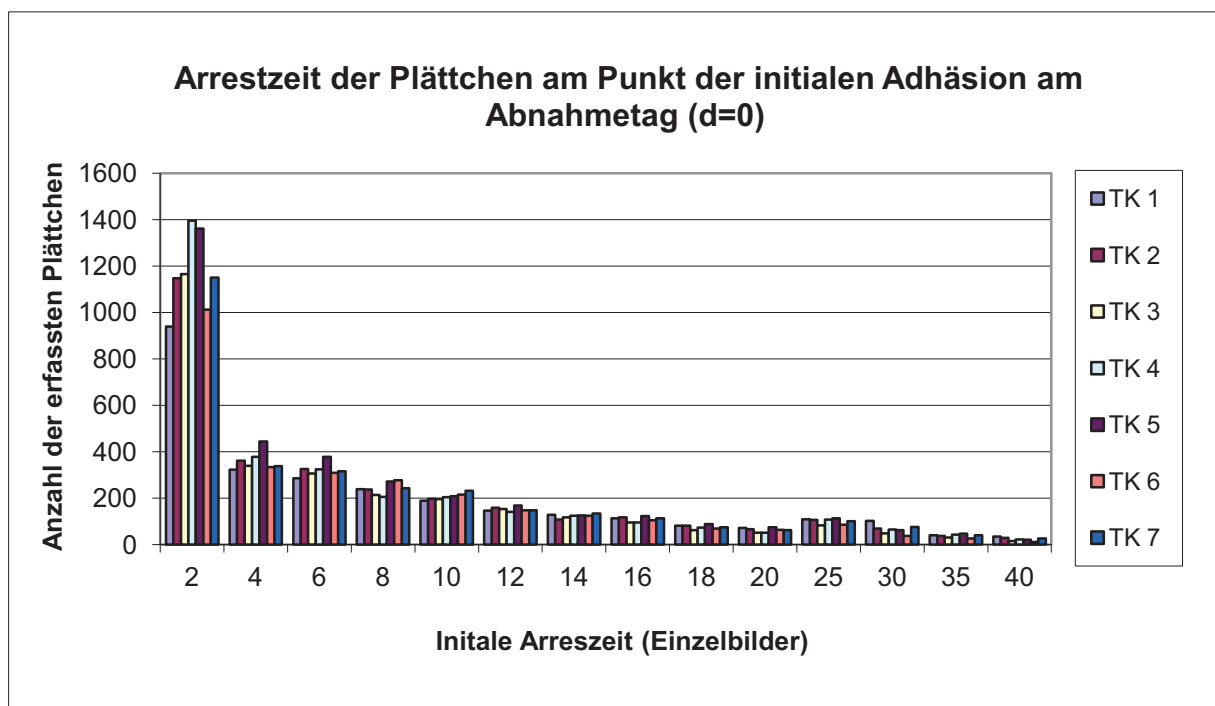


Abbildung 18.- Anzahl der Plättchen die am Punkt der initialen Adhäsion verbleiben entsprechend Ihrer Verweilzeit. Hier zeigt sich, dass die individuellen TK vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der initialen Arrestzeit zeigen. Mehr als ein Drittel der von der Bildauswertung erfassten Plättchen verweilen lediglich für 1-2 Einzelbilder am Punkt der initialen Adhäsion (TK 1 =33% - Tk 4= 43%).

Vergleicht man nun den Abnahmetag mit dem letzten Tag der Beobachtungszeit zeigt sich ein statistisch relevanter Rückgang der Verweilzeit der Plättchen am Punkt ihrer initialen Adhäsion. Während diese im Mittel am Blutabnahmetag noch 0,31sec ( $\pm 0,03$ sec) betrug, lag sie am Tag 7 bei 0,27sec ( $\pm 0,02$ sec).

Es zeigt sich zudem, dass durch die hohe Anzahl der nur kurz stationär verweilenden Plättchen bei alleiniger Betrachtung des Mittelwertes der Verlust an lang adhätierenden Plättchen überdeckt wurde. Gerade diesen lang adhätierenden Plättchen dürfte in der initialen Hämostasie eine große Bedeutung zukommen. Bei einer getrennten Betrachtung der beobachteten Plättchen analog Ihrer Verweilzeit wird ein deutlicher Rückgang der länger als 0,5sec am Punkt der initialen Adhäsion verweilenden Plättchen sichtbar. Dies wird von der folgenden logarhythmisch aufgetragenen Graphik verdeutlicht:

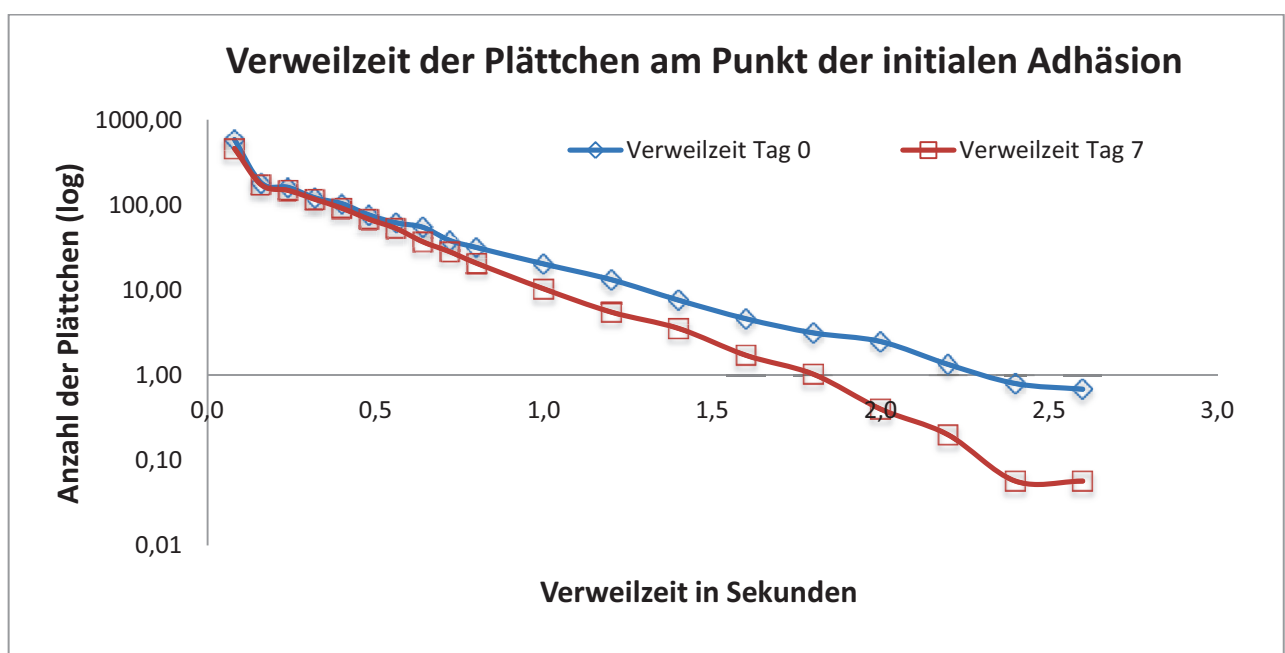


Abbildung 19 – Stationäre Verweilzeit der beobachteten Einzelplättchen am Punkt der initialen Adhäsion:

In der logarithmischen Darstellung zeigt sich deutlich eine Abnahme der länger als 1 Sekunde am initialen Anheftungspunkt verweilenden Plättchen. Gegenübergestellt sind die Verweilzeiten aller Plättchen aus 7 gemessenen TK am Blutabnahmetag (Tag 0, blaue Kurve) vs. dem letzten Tag der Beobachtungszeit (Tag 7, rote Kurve)

#### 5.2.1.4 Auswirkung der Lagerungsdauer auf die Translokationsgeschwindigkeit der Plättchen entlang der Oberfläche

Die Rollgeschwindigkeit bezeichnet die Translokationsgeschwindigkeit, mit der sich die Plättchen unter ständigem Oberflächenkontakt an Glasoberfläche entlang in Strömungsrichtung bewegen. Dieses Phänomen kommt durch transiente Bindung des plättcheneigenen GPIIb $\alpha$ -Rezeptors mit dem auf der Oberfläche gebundenen VWF zustande.

Hier zeigt sich erneut bei alleiniger Betrachtung des Mittelwertes ~~sich~~ nur eine geringfügige Änderung bezogen auf die Gesamtheit der beobachteten Plättchen. Am Abnahmetag betrug die mittlere gemessene Rollgeschwindigkeit  $8,72\mu\text{m/s}$  ( $\pm 0,25\mu\text{m/s}$ ) gegenüber  $8,99\mu\text{m/s}$  ( $\pm 0,23\mu\text{m/s}$ ) am Tag 7 (n.s.). Die einzelnen getesteten TK zeigten eine relativ homogene Verteilung hinsichtlich der ermittelten Rollgeschwindigkeiten.

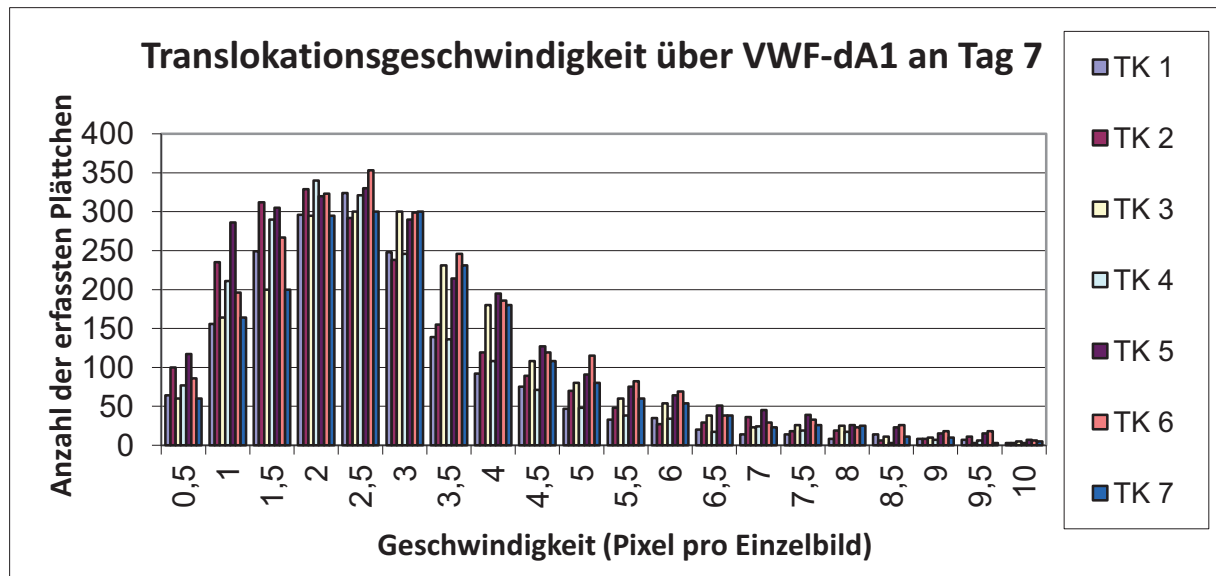


Abbildung 20 – Exemplarische Darstellung der Verteilung der Rollgeschwindigkeiten der einzelnen durch das Bildanalysesystem erfassten Plättchen entlang der VWF-DA1 Oberfläche am Tag 7: Man sieht eine relativ homogene Verteilung zwischen den verschiedenen gemessenen TK.

Teilt man allerdings die an der Oberfläche entlang rollenden Plättchen analog ihrer Rollgeschwindigkeit in verschiedene Gruppen ein, so zeigt sich eine signifikante Abnahme der langsam rollenden Plättchen. Während der Einfluss der Lagerungsdauer auf die Gesamtheit der beobachteten Plättchen wie oben aufgeführt moderat ausfällt, beträgt er in der Gruppe der sich am langsamsten bewegendenden Plättchen, also derer mit einer Rollgeschwindigkeit von  $0 - 1\mu\text{m/s}$  über 70%.

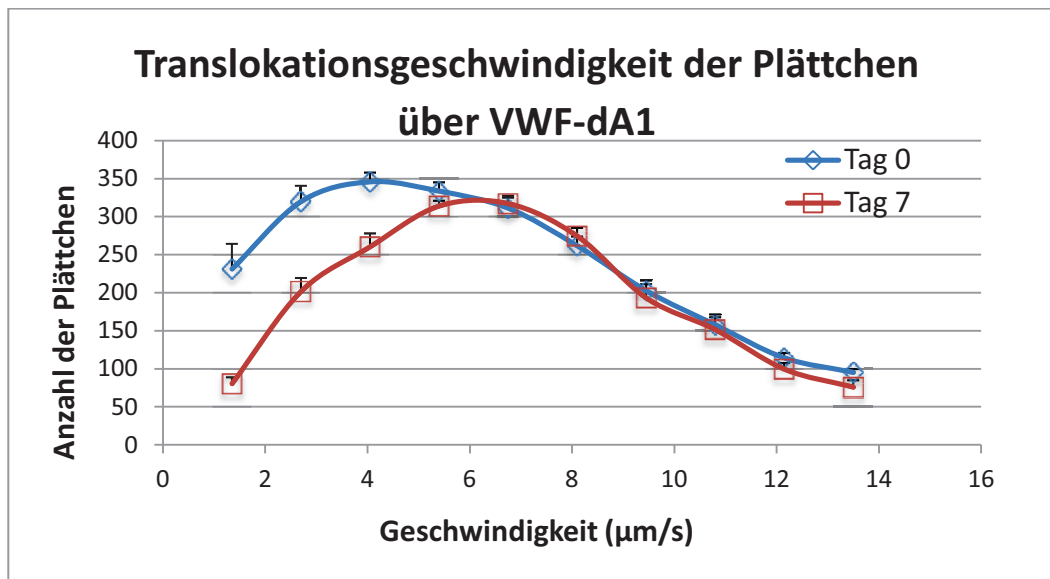


Abbildung 21 –Änderung der Rollgeschwindigkeit der einzelnen Plättchen im Laufe der Lagerungsdauer: Im Vergleich zum Entnahmetag bewegte sich an Tag 7 eine deutliche geringere Anzahl an Plättchen mittels einer transienten Rezeptor-Liganden-Interaktion (VWF-dA1 – GpIb) mit einer langsamen Translokationsgeschwindigkeit über die beschichtete Oberfläche. Während die Kurven im Geschwindigkeitsbereich  $> 5 \mu\text{m/s}$  nahezu deckungsgleich verlaufen, weichen sie im Bereich  $< 5 \mu\text{m/s}$  deutlich auseinander. Die Graphik stellt den MW $\pm$ SEM aus 7 gemessenen TK dar

### 5.2.2 Durchflusszytometrische Untersuchung der Thrombozytenkonzentrate hinsichtlich der Anzahl der Mikropartikel sowie der Änderung der Aktivierungsmarker im Laufe der Lagerungsdauer

Im Anschluss an die Flusskammerexperimente wurden die TK anhand durchflusszytometrischer Untersuchungen weiter charakterisiert. Hierzu wurden verschiedene Probenansätze gemessen. Zum einen wurden die TK mit einem Anti-CD 41 FITC Antikörper sowie mit Annexin V PE-CY5 co-markiert. Außerdem wurden separate Messungen mit einem Anti-CD 42 b FITC Antikörper und einem Anti-CD 62 P FITC Antikörper durchgeführt. Allen durchgeführten Experimenten war gemeinsam, dass sich im Verlauf der Lagerungsdauer ein Anstieg der MP zeigte. Dieser war jedoch für die unterschiedlichen Marker auch unterschiedlich stark ausgeprägt. Am robustesten hatte sich in den bisherigen Experimenten der Anti CD 41 FITC – Antikörper herausgestellt. Hier zeigte sich ein deutlicher Anstieg der MP Zahlen thrombozytären Ursprungs im Verlauf der 7 tägigen Lagerungsdauer wie in der folgenden Abbildung dargestellt:



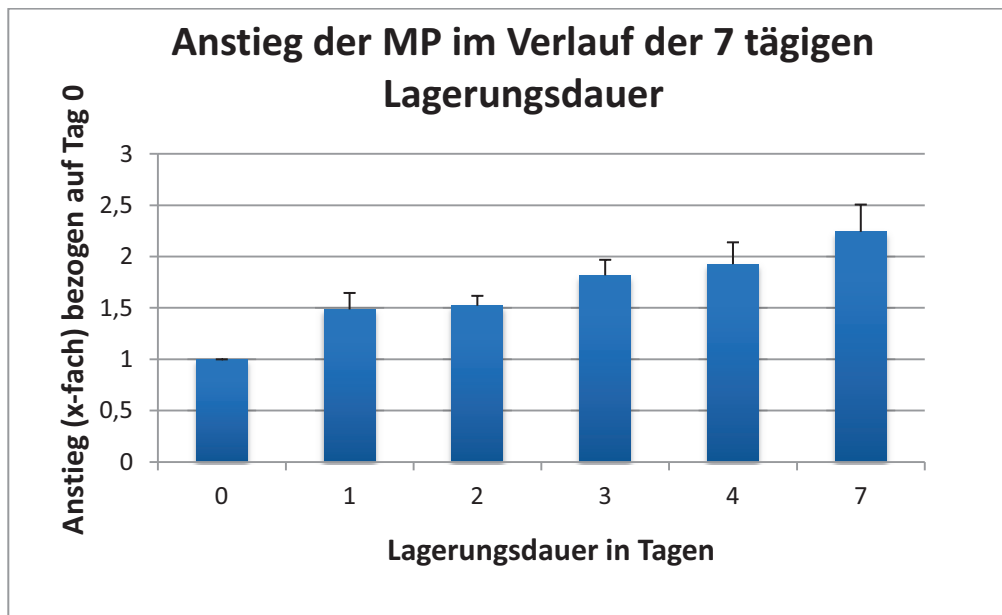


Abbildung 22 – Anstieg der MP Zahlen gemessen anhand des CD 41 Rezeptors: Dargestellt ist der durch Durchflusszytometrie bestimmte Anstieg der CD 41 positiven Mikropartikel innerhalb einer 7 tägigen Lagerungsdauer. Die Werte geben den prozentualen Anstieg der Mikropartikelzahl bezogen auf die Ursprungszahl am Abnahmetag wieder und stellen den MW $\pm$ SEM aus 7 gemessenen TK dar.

Die meisten dieser neu entstanden Mikropartikel waren ebenso positiv für den im selben Ansatz gemessenen Membranaktivierungsmarker Annexin V, während auf den untersuchten Plättchen nur ein schwaches Annexin V Signal nachweisbar war. Bei den untersuchten Plättchen zeigte sich im Verlauf der Lagerung zunächst sogar ein Abfall der Membranaktivierung bezogen auf die Phosphatidylexpression, um dann im Laufe der Lagerungsdauer wieder anzusteigen. Am 7. Lagerungstag war in etwa wieder (annähernd) das Ausgangsniveau erreicht. Der Anstieg der Phosphatidylserin positiven Mikropartikel war stärker ausgeprägt als der anhand des GpIIb/IIIa Oberflächenmarkers bestimmte Anstieg aller thrombozytären Mikropartikel. Jedoch exprimierten auch am 7. Lagerungstag nicht alle gemessenen MP Phosphatidylserin auch ihrer Oberfläche.

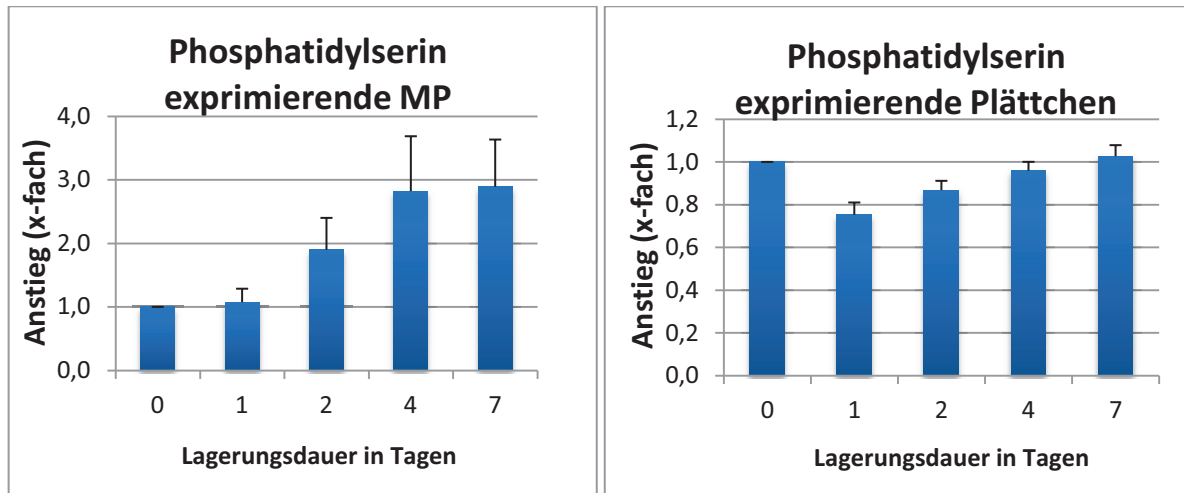


Abbildung 23 –Zwischen Tag 1 und Tag 4 zeigt sich ein deutlicher Anstieg der Phosphatidylserin exprimierenden Mikropartikel. Im Gegensatz dazu zeigt sich bei den durchflusszytometrisch untersuchten Plättchen zunächst ein Abfall der Phosphatidylserin Expression nach dem Abnahmevorgang. In den folgenden Tagen kommt es dann zu einem langsamen Anstieg, der an Tag 7 den Ausgangswert übersteigt. Die Werte stellen den MW+/-SEM aus 7 gemessenen TK dar.

Um mehr über den Einfluss der Lagerungszeit auf die Oberflächeneigenschaften von Plättchen zu erfahren wurden die TK ebenso bezüglich Ihrer P-Selektin Expression untersucht mit Hilfe eines Anti-CD 62-P FITC - Antikörpers. Hier zeigte sich analog zum Anstieg Phosphatidylserin exprimierender MP auch ein starker Anstieg P-Selektin exprimierender MP. Während bei den Plättchen hinsichtlich der Phosphatidylserin Expression auf der Membran jedoch zunächst ein leichter Rückgang sichtbar war, zeigt sich hinsichtlich der P-Selektin Expression ein konstanter Anstieg im Verlauf der Lagerungsdauer. Die Zunahme P-Selektin positiver MP sowie P-Selektin positiver Plättchen im Verlauf der Lagerungsdauer wird in den folgenden Graphiken dargestellt:

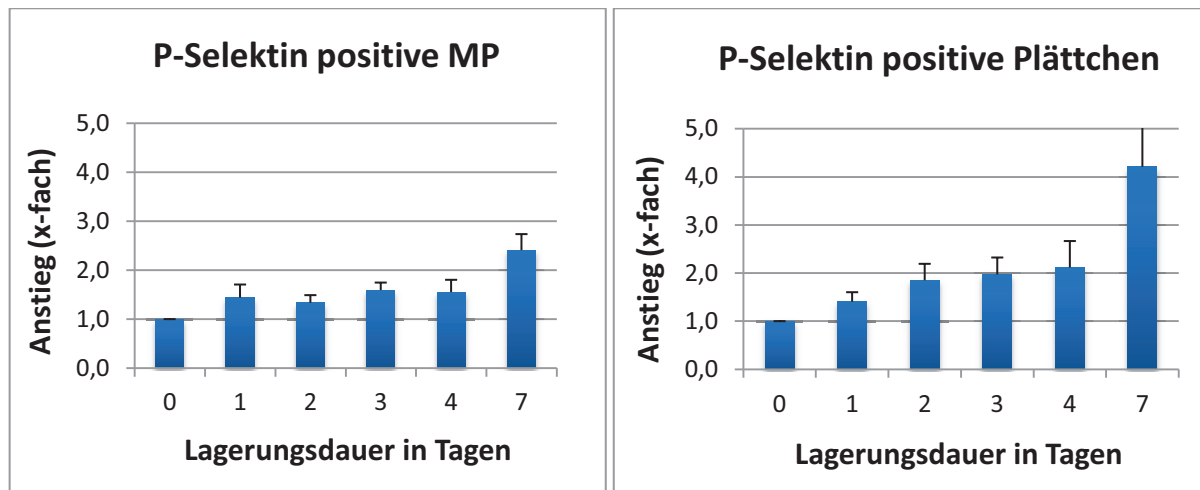


Abbildung 24 –Messwerte aus der fluoreszenzzytometrischen Analyse von TK verdünnt mit HBSS zur f. c. von 200 000 Thrombozyten/ $\mu$ l. Daten wiedergegeben als Anstieg über den Ausgangswert (Tag 0). Im Verlauf der 7 tägigen Lagerungsdauer zeigt sich ein ca. 2,5 facher Anstieg der MP Zahl. Die Werte stellen den MW  $\pm$  SEM aus 7 gemessenen TK dar

In der ebenfalls durchgeführten Untersuchung hinsichtlich der Oberflächenexpression des Gplb-Rezeptors mit Hilfe eines Anti-CD 42b FITC – Antikörpers zeigte sich im Laufe der Lagerungsdauer eine Abnahme der Rezeptordichte von Gplb an der Oberfläche der gemessenen Plättchen, während gleichzeitig der Anstieg der MP Zahl bestätigt wurde. Die relative Zunahme der CD 42b positiven MP war jedoch schwächer ausgeprägt verglichen mit den CD 41 markierten Proben. Dies ist durchaus verständlich, da Gplb im Vergleich zu Gpllb/IIIa in geringerer Konzentration auf der Plättchenmembran exprimiert ist. Somit ist es auch verständlich, dass auf der Oberfläche thrombozytärer MP Gplb in einem geringeren Ausmaß verglichen mit Gpllb/IIIa vorhanden war. Da der Erfassungsmechanismus in meinem Fall auf dem FI-1 Signal beruhte, führte ein schwächeres Signal zu einer geringeren Anzahl an erfassten Partikeln. In Übereinstimmung zu den vorausgehenden Ergebnissen ist im Folgenden der Abfall der Fluoreszenzintensität der Plättchen im Verlauf der 7 tägigen Lagerungsdauer dargestellt, die mit einem CD 42b FITC Antikörper markiert wurden. Dies kann als direktes Maß für die Rezeptordichte auf der Plättchenmembran gesehen werden:

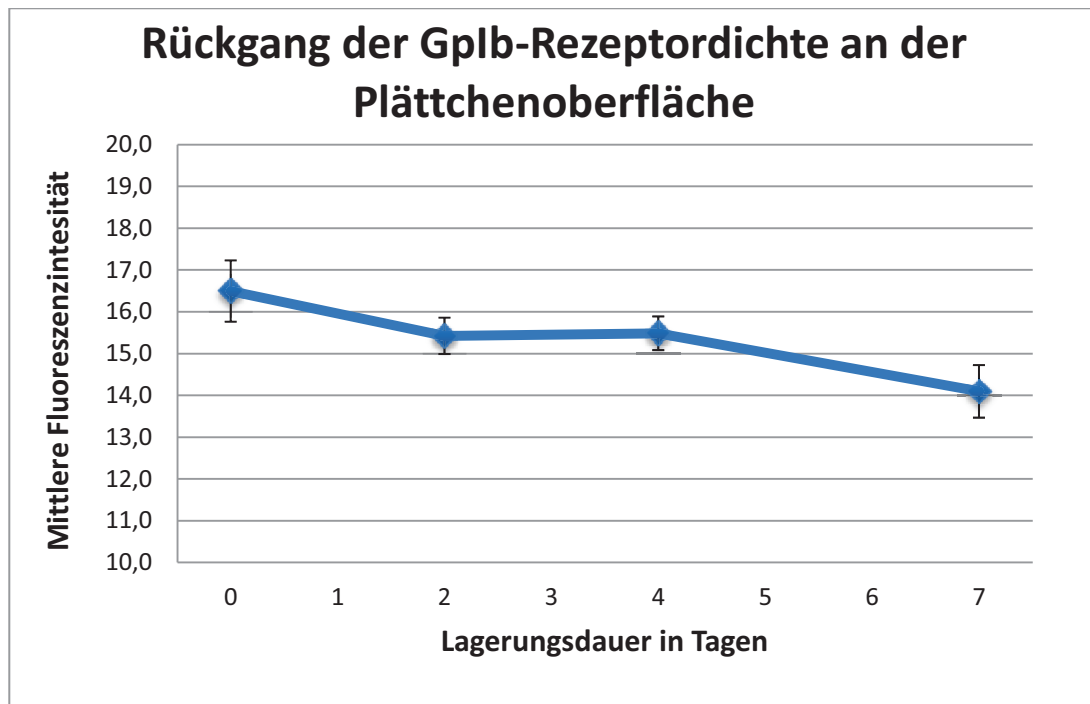


Abbildung 25 – Mittels Durchflusszytometrie bestimmte Fluoreszenzintensität als Indikator für die Anzahl der auf der Plättchenoberfläche zur Verfügung stehenden Gplb-Rezeptoren: Bei Messung der CD 42b FITC markierten Plättchen zeigt sich eine statistisch relevante Abnahme der Fluoreszenzintensität im Laufe der 7 tägigen Lagerungszeit. Die Werte stellen den  $MW \pm SEM$  aus 7 gemessenen TK dar

### 5.2.3 Starker Einfluss der Lagerungsdauer auf die Aggregationsfähigkeit in den Multiplate Untersuchungen

In der Multiplate Analyse ergibt sich mit zunehmender Lagerungsdauer ein starker Abfall der durch die Kollagenreagenz ausgelösten Thrombozytenaggregation. Die Untersuchung wurde am Tag 6 beendet, da die Messwerte an den folgenden Tagen unterhalb der Validierungsschwelle des Gerätes lagen und somit nicht mehr zu verwertbaren Ergebnissen führten. Es zeigt sich, dass sowohl die Gesamtkapazität zur Aggregation abnimmt (Tag 0:  $AUC\ 836 \pm 141\ AU \cdot min$ ; Tag 6:  $AUC\ 122 \pm 27\ AU \cdot min$ ) als auch die Geschwindigkeit mit der diese stattfindet (Tag 0:  $31,4 \pm 5,2\ AU/min$ ; Tag 6:  $3,0 \pm 0,3\ AU/min$ ). Der starke Abfall der Aggregationsfähigkeit war in allen untersuchten TK in etwa gleich stark ausgeprägt.

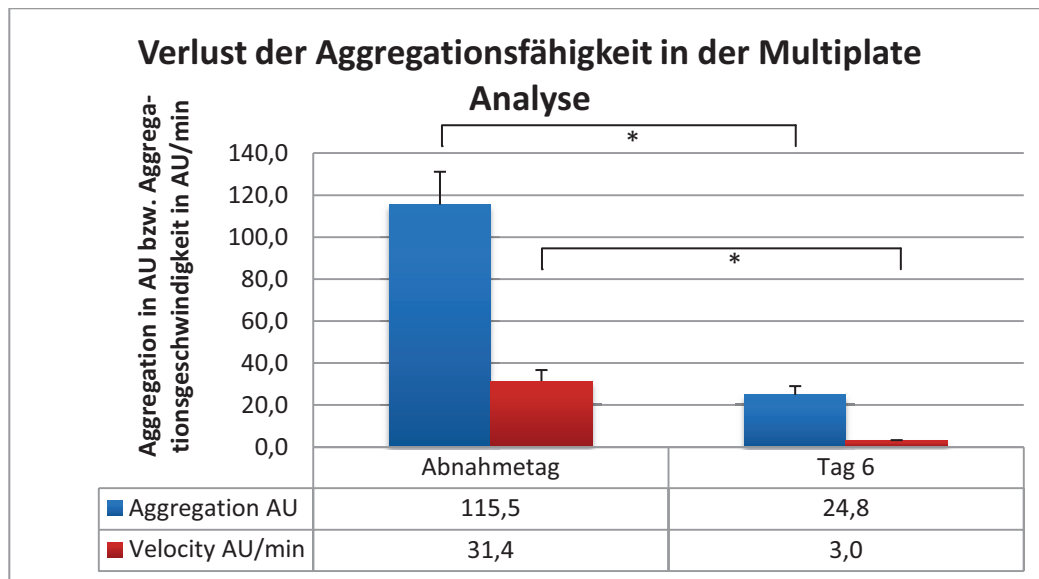


Abbildung 26 – Bestimmung der Aggregationsfähigkeit durch Multiplate Analyse: Es zeigt sich ein starker Abfall im Laufe der Lagerungsdauer. Der Abfall betrifft sowohl die Aggregationskapazität als auch die Geschwindigkeit mit der diese stattfindet. Die Werte stellen den  $MW \pm SEM$  aus 7 gemessenen TK dar.

#### 5.2.4 Anstieg der Thrombingenerierungskapazität von TK im Verlauf der Lagerungsdauer im TDT Test

Die mittels des TDT-Testes ermittelte Thrombin Generierung wurde für jedes TK in 4 verschiedenen Verdünnungsstufen (1:8, 1:16, 1:32 und 1:64) durchgeführt. Dies war erforderlich um einen eventuellen Überschuss an prokoagulatorischen Oberflächen und somit einen Mangel an Substrat zu erkennen. Ein solcher Überschuss an prokoagulatorische Oberflächen trat jedoch in der Versuchsreihe nicht auf, das heißt auch in der niedrigsten Verdünnungsstufe war zu jedem Messzeitpunkt genügend Substrat vorhanden. Daher ergaben sich in allen Verdünnungsstufen vergleichbare Ergebnisse. Über die Lagerungsdauer betrachtet zeigte sich die Thrombin Generierung im Laufe der ersten 5 Lagerungstage abnehmend. Am Tag 5 war sie im Vergleich zum Abnahmetag um ca. 20% verlängert. Die folgende Graphik verdeutlicht, dass alle vier gemessenen Verdünnungsstufen repräsentative und reproduzierbare Ergebnisse lieferten und dass im Gegensatz zu dem starken Abfall der Aggregationsfähigkeit in den Multiplate Assays im Verlauf der Lagerungsdauer die Potenz zur Thrombin Generierung, wenn auch nur geringfügig, ansteigt:

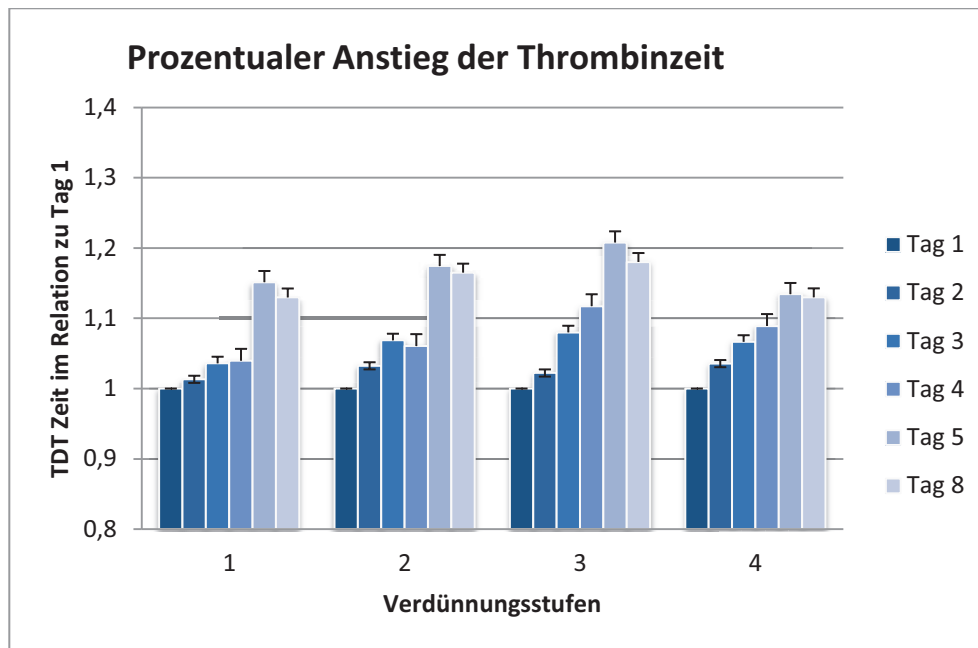


Abbildung 27 – Veränderung der Thrombin Generierungszeit im Verlauf der Lagerungsdauer: die Time to Peak wurde im PRP unter Zugabe einer Thromboplastinlösung in 4 verschiedenen Verdünnungsstufen (1:8, 1:16, 1:32 und 1:64) untersucht. Wiedergegeben sind die MW+/-SEM von 7 TK.

## 6 Diskussion

In den mit Hilfe des Kegel-Platte-Rheometers durchgeführten Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass die Scherung von Plättchen auch ohne das Vorhandensein von immobilisiertem VWF zu einer Entstehung von Mikropartikeln aus Plättchen führt. Diese konnte nicht auf einem intrazellulären *Signaling* ausgelöst durch den Scherstress beruhen, da die Versuche mit citratantikoaguliertem Plasma ausgeführt wurden und somit das auf  $\text{Ca}^{2+}$  angewiesene intrazelluläre *Signaling* blockiert war. Auch die Entstehung der Mikropartikel durch eine Integrin  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_{\text{III}}$  Rezeptor-Interaktion konnte ausgeschlossen werden, da dieser durch die Zugabe von Aggrastat (Tirofiban) blockiert wurde. Dies steht im Gegensatz zu den von Haga et al. veröffentlichten Ergebnissen, die durch Zugabe eines Integrin  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_{\text{III}}$  Inhibitors einen Rückgang der MP Zahlen um bis zu 30% bei hohen Scherraten beobachteten. Deren Versuche wurden jedoch mit einer 10 fach höheren Antikörperkonzentration und mit Gel filtrierten Plättchen durchgeführt[66] und sind daher nicht direkt vergleichbar. Das zusätzliche nahezu vollständige Ausbleiben der MP

Generierung bei Blockade der GPIIb-IIIa Achse unterstützt folgende Interpretation: Die Entstehung von Mikropartikeln unter hohem Scherstress wird nicht durch die mechanische Scherbelastung der Plättchenmembran, sondern durch die scherinduzierte Wechselwirkung von gelöstem VWF und thrombozytärem GPIIb-Rezeptor und die dadurch bedingte Membranextrusion ausgelöst. Diese Erkenntnisse decken sich mit später veröffentlichten Arbeiten von Pontiggia[67] und Gao[68]. Der Unterschied in der absoluten Zahl der generierten Mikropartikel bzw. in der erzielten Blockadewirkung durch den VWF-AK erklären sich durch Unterschiede im Versuchsaufbau, der Scherungsdauer, der verwendeten Antikoagulation sowie in der Qualität des verwendeten Antikörpers. Hier könnte auch ein wirksamer Therapieansatz zur Verhinderung thromboembolischer Komplikationen liegen[69]. Der antithrombotische Effekt eines GPIIb blockierenden Antikörpers wurde schon eindrucksvoll in einem arteriellen Strömungsmodell bei Stenose der Femoralarterie bei Primaten beschrieben[70].

In der Flusskammer wurde von uns die scherungsabhängige Bildung von MP auf einer VWF-Oberfläche visualisiert. Jedoch war in den Kegel-Platte-Versuchen kein solcher immobilisierter VWF auf der Oberfläche vorhanden. Daher stellt sich die Frage an welcher Stelle und auf welche Art und Weise hier die Entstehung der Mikropartikel stattfindet. Inzwischen wurde in weiteren Flusskammerexperimenten ein möglicher Mechanismus für diese aktivierungsunabhängige MP Entstehung ohne das Vorhandensein von immobilisierten VWF aufgedeckt: So führt eine stark erhöhte Scherrate zur Bildung Reversibler Aggregate nicht aktivierter Plättchen[71]. Wenn diese sich aufgrund ihrer Größe mit einer unterschiedlichen Geschwindigkeit im Vergleich zum einzelnen Plättchen bewegen und über ihren GPIIb Rezeptor den aufgrund des hohen Scherstress in elongierter Form vorliegenden VWF auch an Ihrer Oberfläche binden, kann es hier zu Tether und MP-Extrusionen kommen. Somit läge hier ein möglicher Mechanismus für die aktivierungsunabhängige Entstehung von MP in den Kegel-Platte Experimenten. Ein zusätzliches Indiz dafür, dass derselbe Mechanismus in der Flusskammer sowie in den Kegel-Platte Experimenten zur Entstehung von MP führt ist die identische Schwelle der Scherkraft von ca.  $\gamma_{crit} = 5\,000\text{s}^{-1}$ , ab der eine MP und Tether Entstehung ausgelöst wird.



Der Verdacht, dass von den so erzeugten Mikropartikeln eine prokoagulatorische Wirkung ausgeht, konnte durch die Ergebnisse des TDT-Tests bestätigt werden, in dem eine deutliche Verkürzung der Thrombinentstehungszeit mit der Zunahme der MP Zahl einherging. Somit könnten ebensolche MP, die z.B. im Bereich von hochgradigen Koronarstenosen anhand des oben beschriebenen Mechanismus entstehen, durchaus für die Entwicklung von thromboembolischen Komplikationen eine Rolle spielen.

Hinsichtlich des Einflusses der Lagerungsdauer auf die Funktionsfähigkeit der TK lässt sich in den durchgeführten Untersuchungen eine graduelle Verschlechterung darstellen, die sich auf verschiedenen Ebenen widerspiegelt und in den verwendeten Tests unterschiedlich stark zur Geltung kommt:

Da sich die Oberfläche der Flusskammer in unserem Versuchsaufbau im Laufe der Versuchstage nicht änderte, und der visualisierten Plättchenadhäsion eine direkte Interaktion zwischen den Thrombozyten und der VWF-DA1 Beschichtung zugrunde liegt, musste der verminderten Adhäsionsfähigkeit eine Veränderung der Membran- und/oder Rezeptoreigenschaften der Plättchen zu Grunde liegen. Diese führt entweder dazu, dass es weniger Plättchen gelingt, mit der Oberfläche in Kontakt zu kommen, oder dass der einmal gefundene Kontakt wieder abreißt und sich das Plättchen von der Oberfläche und damit aus dem Sichtfeld des Betrachters entfernt. Da die Oberfläche mit VWF-DA1 beschichtet war und somit bei den untersuchten hohen Scherraten nur eine Adhäsion über den Gplb-Rezeptor möglich ist, liegt es nahe, dass die hier sichtbare Veränderung auf einem Verlust an Gplb-Rezeptoren beruht. Dieser schon früher in der Literatur beschriebene Effekt beruht vermutlich auf einem Abbau des Gplb-Rezeptors durch eine Protease[72]. Diese Vermutung bestätigte sich in der durchflusszytometrischen Analyse. Das Absinken der für den CD 42b Rezeptor gemessenen Fluoreszenzintensität bedeutet ein Verlust des Gplb Oberflächenrezeptors im Laufe der Lagerungsdauer. Diese Beobachtung deckt sich mit den bisher veröffentlichten Ergebnissen zum Einfluss der Lagerungsdauer auf die Gplb-Rezeptordichte[73]. Dies könnte auch der Grund für den Anstieg der Translokationsgeschwindigkeit sein. Bedingt durch die geringere Dichte an Gplb Rezeptoren und damit verminderte Zahl an DAPs können die Plättchen der auf sie einwirkenden Scherkraft weniger widerstehen und entfernen sich somit schneller vom Ort der initialen

Anheftung. Übereinstimmend dazu fand ich zum einen höhere Rollgeschwindigkeiten mit zunehmender Lagerungsdauer und zum anderen eine Abnahme der Verweilzeit am Punkt der initialen Plättchenadhäsion.

Als möglicher Erklärungsansatz für den Verlust an Oberflächenrezeptoren wäre auch ein starker Verlust an Membran wie er z.B. durch die Bildung von Mikropartikel im Rahmen einer Vesikulation zu erklären wäre. Zwar findet dies wohl durchaus statt, aber nicht in einem solchen Maß, dass es den Verlust an Auflagefläche erklären könnte. Der Anstieg der Mikropartikel Zahlen müsste hierfür weitaus höher liegen. Zudem würde sich ein solcher Verlust an Plättchenvolumen sowohl im FSC des Durchflusszytometers als auch im MPV widerspiegeln. Somit sprechen die gefundenen Daten für einen Abbau des Gplb-Rezeptors an der Plättchenoberfläche.

Die fluoreszenzzytometrischen Messungen spiegeln zudem eine mit der TK Lagerungszeit zunehmende Plättchenaktivierung und Mikropartikelentstehung wieder. Insbesondere die Expression von P-Selektin, Phosphatidylserin auf Plättchen und MP und die Zahl der MP thrombozytären Ursprungs steigen im Laufe der Lagerungsdauer stark an. Hierdurch würde man eigentlich analog zu den durchgeführten Kegel-Platte Experimenten eine Beschleunigung der Thrombinentstehung im TDT Test vermuten. Diese zeigte sich jedoch in den durchgeführten Experimenten nicht. Zu bedenken ist hierbei jedoch, dass zur Einleitung der Thrombin Entstehung relevante Gerinnungsfaktoren ebenso wie das Prothrombin einem enzymatischen Abbau unterliegen. Vor diesem Hintergrund wäre ein deutlich stärker ausgeprägter Abfall der Gerinnungszeit anzunehmen, der wohl durch den Zuwachs an prokoagulatorischer Membranoberfläche nahezu kompensiert wird. Hier sind sicherlich weitere Versuche z. B. mit Hilfe eines Xa Generierungsassays notwendig. Eine unerwartete Beobachtung war, dass die Annexin V-Bindung am Tag der Apherese zunächst höher lag als an den folgenden Tagen und erst gegen Ende der 7 tägigen Lagerungsdauer wieder Ihren Ursprungswert erreichte. Im Gegensatz dazu nahm die Zahl Annexin V positiver MP kontinuierlich im Laufe der Lagerungsdauer zu. Eine mögliche Erklärung hierfür ist eine passagere Aktivierung der Plättchen am Tag der Apherese. Dies könnte bedeuten, dass Plättchen mit aktivierter Zellmembran, das heißt Plättchen mit der Expression von Phosphatidylserin auf dem äußeren Blatt der Zellmembran in der Lage sind, diese

Aktivierung rückgängig zu machen und wieder in einen nicht-aktivierten Zustand zurückzukehren, z.B. im Sinne einer reversiblen frühen Plättchenaktivierung[74].

In Zusammenschau der durchgeführten Experimente zeigt sich anhand der funktionellen Visualisierung im Strömungskanal, dass die Funktionseinbußen hinsichtlich der Adhäsionsfähigkeit deutlich geringer ausfallen als durch Nicht-Strömungstests wie z.B. das Multiplate-Assay angezeigt und somit TK innerhalb der Lagerungsdauer von fünf Tagen ihre Funktionsfähigkeit weitgehend zu behalten scheinen.

## **7 Zusammenfassung**

Obwohl die Existenz von Mikropartikeln im menschlichen Blut schon seit den 1960'er Jahren bekannt war, wusste man bislang wenig über den Entstehungsprozess dieser Mikropartikel aus Blutplättchen. In der Arbeit von Hanna Schuhmann konnte gezeigt werden, dass eine Perfusion von Vollblut mit hohen Strömungsraten über eine mit VWF oder Thrombin beschichtete Oberfläche zu der Entstehung von Mikropartikeln führt. In den Kegel-Platte-Rheometer Versuchen konnte ich nachweisen, dass auch hier ein hoher Scherstress zu einer, im Vergleich zu den Flusskammeruntersuchungen sogar wesentlich deutlicher ausgeprägten, Erzeugung von Mikropartikeln führt. Aber die wesentliche, neue Erkenntnis war sicherlich, dass eine Blockade des VWF durch den funktionsblockierenden AK NMC-4 diesen Effekt völlig unterbindet. Somit war bewiesen, dass diese Erzeugung von Mikropartikeln einzig auf der Gplb-VWF Interaktion, und nicht auf anderen Rezeptor Interaktionen oder auf einem stressinduzierten intrazellulärem Signaling beruht. In einem zweiten Schritt konnte ich mit Hilfe von Gerinnungssays zeigen, dass diese so erzeugten Mikropartikel prokoagulativ sind. Daher lag der Gedanke nahe, dass diese auch eine klinische Relevanz besitzen.

Um die so gewonnen Erkenntnisse in einen klinischen Kontext zu stellen untersuchte ich in Folge die Mikropartikelentstehung in langzeitgelagerten Thrombozytenkonzentraten und den Einfluss der Lagerungsdauer auf die Adhäsionsfähigkeit der enthaltenen Blutplättchen. Hier zeigte sich, dass im Verlauf der Lagerungsdauer die Zahl an Mikropartikel deutlich

zunimmt und sich zunehmend Aktivierungsmarker wie P-Selektin oder Phosphatidylserin an Ihrer Oberfläche nachweisen lassen. Jedoch war hier in den durchgeführten Gerinnungssassay ein prokoagulatorischer Effekt der Mikropartikel nicht eindeutig nachweisbar. In Bezug auf die enthaltenen Blutplättchen zeigte sich ein Abfall der Gplb-Rezeptordichte an der Plättchenoberfläche im Verlauf der Lagerungsdauer. Korrelierend hierzu war in den Flusskammerversuchen ein Abfall der Adhäsionsfähigkeit der Blutplättchen auf einer mit VWF beschichteten Oberfläche nachweisbar. Die Flusskammerversuche wurden hierfür mittels einer eigens entwickelten computergestützten Bildanalyse ausgewertet. Da die Dichte der Oberflächenbeschichtung mit VWF in der Flusskammer an jedem Versuchstag konstant war liegt der Verdacht nahe, dass die verminderte Adhäsionsfähigkeit ausgedrückt durch einen verminderten Oberflächenbesatz und durch eine zunehmende Rollgeschwindigkeit der Blutplättchen auf die sinkende Gplb-Rezeptordichte an der Plättchenoberfläche zurückzuführen ist.

Dieser Verlust an Adhäsionsfähigkeit im Verlauf der Lagerungsdauer war jedoch auf die Gesamtheit der beobachtete Plättchen gesehen nur gering ausgeprägt, daher müssen erst weiter Experimente zeigen, ob diesem in der Bildanalyse nachweisbaren Verlust an Adhäsionsfähigkeit auch eine klinische Relevanz zuzumessen ist.

## 8 Bibliographie

1. Wolf, P., *The nature and significance of platelet products in human plasma*. Br J Haematol, 1967. **13**(3): p. 269-88.
2. Mallat, Z., et al., *Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes*. Circulation, 2000. **101**(8): p. 841-3.
3. Walenta, K.L., et al., *Circulating microparticles in septic shock*. Am J Respir Crit Care Med, 2009. **180**(1): p. 100; author reply 100-1.
4. Amin, C., N. Mackman, and N.S. Key, *Microparticles and cancer*. Pathophysiol Haemost Thromb, 2008. **36**(3-4): p. 177-83.
5. Murphy, S. and F.H. Gardner, *Effect of storage temperature on maintenance of platelet viability--deleterious effect of refrigerated storage*. N Engl J Med, 1969. **280**(20): p. 1094-8.
6. Funk, M.B., et al., *[Evaluation of measures aimed to reduce serious adverse transfusion reactions (hemovigilance data from 1997 to 2008)]*. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. **53**(4): p. 347-56.
7. Mackie, I.J. and H.A. Bull, *Normal haemostasis and its regulation*. Blood Rev, 1989. **3**(4): p. 237-50.
8. Staubesand, J., *[Spontaneous closure of injured arteries.]*. Medizinische, 1957. **25**(45): p. 1663-6.
9. Broos, K., et al., *Platelets at work in primary hemostasis*. Blood Rev, 2011. **25**(4): p. 155-67.
10. Savage, B., M. Cattaneo, and Z.M. Ruggeri, *Mechanisms of platelet aggregation*. Curr Opin Hematol, 2001. **8**(5): p. 270-6.
11. Ribatti, D. and E. Crivellato, *Giulio Bizzozzero and the discovery of platelets*. Leuk Res, 2007. **31**(10): p. 1339-41.
12. Junt, T., et al., *Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow*. Science, 2007. **317**(5845): p. 1767-70.
13. Chernoff, A., R.F. Levine, and D.S. Goodman, *Origin of platelet-derived growth factor in megakaryocytes in guinea pigs*. J Clin Invest, 1980. **65**(4): p. 926-30.
14. Handagama, P.J., et al., *Circulating proplatelets: isolation and quantitation in healthy rats and in rats with induced acute blood loss*. Am J Vet Res, 1987. **48**(6): p. 962-5.
15. Ballem, P.J., et al., *Kinetic studies of the mechanism of thrombocytopenia in patients with human immunodeficiency virus infection*. N Engl J Med, 1992. **327**(25): p. 1779-84.
16. Goldsmith, H.L. and S.G. Mason, *Further comments on the radial migration of spheres in Poiseuille flow*. Biorheology, 1965. **3**(1): p. 33-6.
17. Goldsmith, H.L., G.R. Cokelet, and P. Gaehtgens, *Robin Fahraeus: evolution of his concepts in cardiovascular physiology*. Am J Physiol, 1989. **257**(3 Pt 2): p. H1005-15.

18. Livio, M., et al., *Uraemic bleeding: role of anaemia and beneficial effect of red cell transfusions*. Lancet, 1982. **2**(8306): p. 1013-5.
19. Pfreundschuh, M. and J. Schölmerich, *Pathophysiologie, Pathobiochemie*. Elsevier Urban & Fischer, 2004. **2**.
20. Freyssinet, J.M., *Cellular microparticles: what are they bad or good for?* J Thromb Haemost, 2003. **1**(7): p. 1655-62.
21. Thiagarajan, P. and J.F. Tait, *Binding of annexin V/placental anticoagulant protein I to platelets. Evidence for phosphatidylserine exposure in the procoagulant response of activated platelets*. J Biol Chem, 1990. **265**(29): p. 17420-3.
22. Muller, I., et al., *Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets*. Faseb J, 2003. **17**(3): p. 476-8.
23. VanWijk, M.J., et al., *Microparticles in cardiovascular diseases*. Cardiovasc Res, 2003. **59**(2): p. 277-87.
24. Toth, B., et al., *Platelet-derived microparticles and coagulation activation in breast cancer patients*. Thromb Haemost, 2008. **100**(4): p. 663-9.
25. Sabatier, F., et al., *Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles*. Diabetes, 2002. **51**(9): p. 2840-5.
26. Diamant, M., et al., *Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease?* Eur J Clin Invest, 2004. **34**(6): p. 392-401.
27. Ruggeri, Z.M., *Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions*. J Thromb Haemost, 2003. **1**(7): p. 1335-42.
28. Schneider, S.W., et al., *Shear-induced unfolding triggers adhesion of von Willebrand factor fibers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(19): p. 7899-903.
29. Varughese, K.I., R. Celikel, and Z.M. Ruggeri, *Structure and function of the von Willebrand factor A1 domain*. Curr Protein Pept Sci, 2002. **3**(3): p. 301-12.
30. Lankhof, H., et al., *A3 domain is essential for interaction of von Willebrand factor with collagen type III*. Thromb Haemost, 1996. **75**(6): p. 950-8.
31. Reininger, A.J., *Function of von Willebrand factor in haemostasis and thrombosis*. Haemophilia, 2008. **14 Suppl 5**: p. 11-26.
32. Schweiberer, L., F. Wendlberger, and W. Licht, *[Surgical interventions in von Willebrand's-Jurgens-syndrome]*. Med Klin, 1966. **61**(22): p. 888.
33. Reininger, A.J., et al., *Mechanism of platelet adhesion to von Willebrand factor and microparticle formation under high shear stress*. Blood, 2006. **107**(9): p. 3537-45.
34. Ruggeri, Z.M., *Platelet adhesion under flow*. Microcirculation, 2009. **16**(1): p. 58-83.
35. Raucher, D. and M.P. Sheetz, *Characteristics of a membrane reservoir buffering membrane tension*. Biophys J, 1999. **77**(4): p. 1992-2002.
36. Reininger, A.J., *Platelet function under high shear conditions*. Hamostaseologie, 2009. **29**(1):

p. 21-2, 24.

37. Drake, T.A., J.H. Morrissey, and T.S. Edgington, *Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis*. Am J Pathol, 1989. **134**(5): p. 1087-97.
38. Edgington, T.S., et al., *The structural biology of expression and function of tissue factor*. Thromb Haemost, 1991. **66**(1): p. 67-79.
39. Mann, K.G., et al., *Models of blood coagulation*. Blood Cells Mol Dis, 2006. **36**(2): p. 108-17.
40. Giesen, P.L., et al., *Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 2311-5.
41. Ruf, W., *The interaction of activated factor VII with tissue factor: insight into the mechanism of cofactor-mediated activation of activated factor VII*. Blood Coagul Fibrinolysis, 1998. **9 Suppl 1**: p. S73-8.
42. Baglia, F.A. and P.N. Walsh, *Thrombin-mediated feedback activation of factor XI on the activated platelet surface is preferred over contact activation by factor XIIIa or factor XIa*. J Biol Chem, 2000. **275**(27): p. 20514-9.
43. Martorell, L., et al., *Thrombin and protease-activated receptors (PARs) in atherothrombosis*. Thromb Haemost, 2008. **99**(2): p. 305-15.
44. Toschi, V., et al., *Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques*. Circulation, 1997. **95**(3): p. 594-9.
45. Ruggeri, Z.M., et al., *Unravelling the mechanism and significance of thrombin binding to platelet glycoprotein Ib*. Thromb Haemost. **104**(5): p. 894-902.
46. Gawaz, M., F.J. Neumann, and A. Schomig, *Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease : consequences for diagnosis and therapy*. Circulation, 1999. **99**(1): p. E1-E11.
47. Freireich, E.J., et al., *Response to Repeated Platelet Transfusion from the Same Donor*. Ann Intern Med, 1963. **59**: p. 277-87.
48. Mourad, N., *A simple method for obtaining platelet concentrates free of aggregates*. Transfusion, 1968. **8**(1): p. 48.
49. Mehta, S. and J.T. Watson, *Platelet rich concentrate: basic science and current clinical applications*. J Orthop Trauma, 2008. **22**(6): p. 432-8.
50. Boggs, D.R., *Amegakaryocytic thrombocytopenia*. Am J Hematol, 1985. **20**(4): p. 413-6.
51. Spahn, D.R., et al., *Management of bleeding following major trauma: a European guideline*. Crit Care, 2007. **11**(1): p. R17.
52. Gunter, P., *Practice guidelines for blood component therapy*. Anesthesiology, 1996. **85**(5): p. 1219-20.
53. Bundesärztekammer, *Querschnitts-Leitlinien (BÄK) zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten*. Deutscher Ärzte-Verlag Köln, 2009.



54. Penz, S., *Aktivierung von Thrombozyten durch humane artherosklerotische Plaques: Mechanismen und Inhibition*, in *Faculty of medicine* 2008, LMU München: Munich.
55. Tangelder, G.J., et al., *Wall shear rate in arterioles in vivo: least estimates from platelet velocity profiles*. *Am J Physiol*, 1988. **254**(6 Pt 2): p. H1059-64.
56. Azuma, H., et al., *Disulfide bond requirements for assembly of the platelet glycoprotein Ib-binding domain of von Willebrand factor*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(4): p. 2821-7.
57. Houben, S., *Reflection Interference Contrast Microscopy (RICM) and Antiflex Technique*, 2008, Forschungszentrum Jülich - Institute of BIO- and Nanosystems (IBN).
58. Faigle, W., *Selected physical properties of Printing inks*, 1997, Hochschule für Druck und Medien Stuttgart.
59. BeckmannCoulter. *Flow Cytometers - Technical Principles*. 2008 16.10.2008 [cited 2008 16.10.2008]; Available from: [www.beckmancoulter.com](http://www.beckmancoulter.com).
60. Fabian, K. *Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers*. [image/png] 2012 [cited 2012 18.08.2012]; Available from: <http://de.wikipedia.org/wiki/Durchflusszytometrie>.
61. Calatzis, A., M. Spannagl, and W. Schramm, *Effect of Variations of single factor activity on thrombin generation as determined by the Thrombin dynamics test*. *Thromb Haemost*, 2007. **Volume 5**(Supplement 2): p. P-S-124.
62. Cardinal, D.C. and R.J. Flower, *The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood*. *J Pharmacol Methods*, 1980. **3**(2): p. 135-58.
63. Toth, O., et al., *Multiple electrode aggregometry: a new device to measure platelet aggregation in whole blood*. *Thromb Haemost*, 2006. **96**(6): p. 781-8.
64. VerumDiagnostics. *Multiplate - The new standard for platelet diagnostics*. 2008 [cited 2008 14.10.2008]; Available from: [www.multiplate.net](http://www.multiplate.net).
65. Jilma-Stohlawetz, P., et al., *In vitro platelet function of platelet concentrates prepared using three different apheresis devices determined by impedance and optical aggregometry*. *Transfusion*, 2009. **49**(8):1564-8
66. Haga, J.H., L.K. Jennings, and S.M. Slack, *Inhibition of shear-stress-induced platelet aggregation and phosphotyrosine signaling by GPIIb-IIIa antagonists*. *Ann Biomed Eng*, 2002. **30**(10): p. 1262-72.
67. Pontiggia, L., et al., *Platelet microparticle formation and thrombin generation under high shear are effectively suppressed by a monoclonal antibody against GPIIb-IIIa*. *Thromb Haemost*, 2006. **96**(6): p. 774-80.
68. Gao, Z., et al., *Effects of von Willebrand factor concentration and platelet collision on shear-induced platelet activation*. *Thromb Haemost*, 2008. **100**(1): p. 60-8.
69. Penz, S.M., et al., *Glycoprotein Ib $\alpha$  inhibition and ADP receptor antagonists, but not aspirin, reduce platelet thrombus formation in flowing blood exposed to atherosclerotic plaques*. *Thromb Haemost*, 2007. **97**(3): p. 435-43.
70. Cauwenberghs, N., et al., *Antithrombotic effect of platelet glycoprotein Ib-blocking monoclonal antibody Fab fragments in nonhuman primates*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*,

2000. **20**(5): p. 1347-53.

71. Ruggeri, Z.M., et al., *Activation-independent platelet adhesion and aggregation under elevated shear stress*. Blood, 2006. **108**(6): p. 1903-10.
72. Fox, J.E., *Shedding of adhesion receptors from the surface of activated platelets*. Blood Coagul Fibrinolysis, 1994. **5**(2): p. 291-304.
73. Thon, J.N. and D.V. Devine, *Translation of glycoprotein IIIa in stored blood platelets*. Transfusion, 2007. **47**(12): p. 2260-70.
74. Holinstat, M., et al., *Irreversible platelet activation requires protease-activated receptor 1-mediated signaling to phosphatidylinositol phosphates*. Mol Pharmacol, 2009. **76**(2): p. 301-13.

## 9 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Armin Reininger, für die Überlassung des interessanten Themas und für die Betreuung während der Experimente sowie im Anschluss bei der Erstellung dieser Arbeit bedanken.

Zudem möchte ich mich bei Herrn Prof. Wolfgang Schramm und bei Herrn Prof. Michael Spannagel bedanken, in deren Institut diese Arbeit angefertigt wurde und die bei Bedarf immer ein offenes Ohr für mich hatten. Außerdem gilt mein Dank Herrn Dr. Georg Wittman für stets gute Zusammenarbeit und Herrn Prof. Bernd Engelmann für die Überlassung des Kegel-Platte-Rheometers.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Zaverio Ruggeri, der es mir für ein halbes Jahr ermöglichte, als ein vollwertiges Mitglied in seinem Team meine Forschung am Scripps Research Institute (San Diego, CA, USA) fortzuführen.

Vielen herzlichen Dank auch an Herrn Prof. Wolfgang Siess für die Organisation der Minerva School 2010 „Frontiers in Vascular Biology“ (Jerusalem, Israel), bei der ich die Gelegenheit hatte, Teile dieser Arbeit zu präsentieren.

Mein Dank gilt natürlich auch allen freiwilligen Blutspendern und Blutspenderinnen, ohne deren Hilfe die Erstellung dieser Arbeit gar nicht möglich gewesen wäre.

Zu guter Letzt möchte ich bei meinen Eltern und meinen Geschwistern bedanken, die mich immer unterstützt haben und mir stets hilfreich zur Seite standen.